

Simon Brunnquell

**Elektrische Charakterisierung von L929 Fibroblasten
mittels Mikroelektroden**

Masterarbeit

an der Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften

der Technischen Universität Ilmenau

im Studiengang Miniaturisierte Biotechnologie

Fachbereich Analysenmesstechnik des IBA Heiligenstadt

Gutachter: Prof. Dr. Uwe Pliquett

Zweitgutachter: Laura Diaz (M.Sc.)

urn:nbn:de:gbv:ilm1-2016200046

Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, Signale von Zellen mittels Mikroelektroden aufzunehmen und mit einer Whole-Cell-Clamp Anordnung als etablierte Referenzmethode eine simultane Messung vorzunehmen. Bei der Auswertung der Signale der Zelle sollten dann überdies die elektrischen Eigenschaften der Mikroelektroden mit berücksichtigt werden. Einen Schwerpunkt der Arbeit bildete aber vor allem der Prozess der Herstellung der Mikroelektroden aus Kohlefasern und Bonddrähten aus Gold. Im Rahmen dieser Arbeit ist es aber nicht gelungen, eine simultane Messung durchzuführen. Genauso wenig ist es gelungen, Unterschiede der Signale der Mikroelektroden alleine im Vergleich zu Signalen der Mikroelektroden in Kontakt mit den Zellen auszumachen. Jedoch konnten schließlich die elektrischen Eigenschaften einer Mikroelektrode im Zuge einer Verdünnungsreihe mittels Impedanzspektroskopie präzise untersucht werden.

Abstract

The aim of this work was to record signals from cells with microelectrodes and to perform a simultaneous measurement with a whole-cell-clamp configuration as a reference method. For the analysis of the signals arising from the cells the electrical properties of the microelectrodes should have been taken into account. The emphasis of this work was the fabrication of the microelectrodes from carbon fibers and gold bond wires. Within the scope of this work a simultaneous measurement was not achieved. A difference in the signals of bare electrodes and electrodes in contact with the cells could not be observed as well. However it was possible to determine the electrical properties of a microelectrode in the course of a dilution series using precise impedance spectroscopy.

Inhalt

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
Abkürzungen	VI
Konstanten	VI
Symbole	VI
1 Einleitung	1
2 Theorie	3
2.1 Elektrische Grundlagen.....	3
2.1.1 Der Widerstand.....	3
2.1.2 Der Kondensator.....	4
2.1.3 Der Blindwiderstand.....	5
2.1.4 Die Impedanz	5
2.2 Vorgänge an einer Metallelektrode in Kontakt mit einer Elektrolytlösung	6
2.3 Elektrische Eigenschaften der Zellmembran	9
2.3.1 Die Transmembranspannung	10
2.3.2 Passive elektrische Eigenschaften der Membran.....	11
2.4 Messmethoden	13
2.4.1 Patch-Clamp.....	13
2.4.2 Impedanzspektroskopie.....	14
3 In Quarzglas eingebettete Elektroden	17
3.1 Vorüberlegungen.....	17
3.1.1 Spannungsquelle und Verstärker	17
3.1.2 Der Pipettenhalter	19
3.2 Herstellung	20
3.2.1 Erste Versuche mit Goldbonddrähten	20
3.2.1.1 Einbetten in Hartwachs	20
3.2.1.2 Ätzen mit Iod-Kaliumiodid-Lösung	22
3.2.1.3 Elektroerosion	23
3.2.2 Herstellung von Kohlefaserelektroden	24
3.2.2.1 Spezielle Vorkehrungen.....	24
3.2.2.2 Besprühen mit Urethan.....	25
3.2.2.3 Schleifen mit Handbohrgerät	25
3.3 Erste Tests.....	26
3.3.1 Kontakt mit einem mit Iridium besputterten Titanstift.....	26
3.3.1.1 Versuchsaufbau	26
3.3.1.2 Ergebnisse und Diskussion	26
3.3.2 Heranfahen an eine Zelle.....	27
3.3.2.1 Versuchsaufbau	27
3.3.2.2 Ergebnisse und Diskussion	28
3.3.3 Einstich in eine Luftblase	29
3.3.3.1 Versuchsaufbau	29
3.3.3.2 Ergebnisse und Diskussion	29

4 Versuch des Auslösens einer Hyperpolarisation Activation (H. A.).....	31
4.1 Vorbemerkungen	31
4.2 Material und Methoden.....	32
4.3 Ergebnisse.....	33
4.4 Diskussion.....	34
5 In PMMA eingebettete Elektroden	36
5.1 Herstellung	36
5.2 Erste Spektren	38
5.3 Entgültiger Versuchsaufbau	39
5.3.1 Vorbereitung der Zellen	39
5.3.2 Verwendete Mikropipetten.....	39
5.3.3 Durchführung.....	39
5.4 Ergebnisse und Diskussionen.....	41
5.4.1 Kohlefaser.....	41
5.4.1.1 Ergebnisse.....	41
5.4.1.2 Diskussion.....	42
5.4.2 Goldbonddraht	43
5.4.2.1 Ergebnisse.....	43
5.4.2.2 Diskussion.....	44
5.5 Verdünnungsreihe mit Goldelektrode.....	45
5.5.1 Durchführung.....	46
5.5.2 Ergebnisse.....	46
5.5.3 Auswertung.....	48
6 Abschließende Bemerkungen.....	53
7 Danksagungen	55
8 Literatur.....	56
Anhang.....	59

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Schaltbild eines einzelnen Widerstandes	3
Abbildung 2	Schaltbild eines Kondensators	4
Abbildung 3	Schichten an einer Grenzfläche zwischen einem Metall und einem Elektrolyten (nach Pliquett et al., 2010).....	8
Abbildung 4	Ansatz zur Berechnung des Streuwiderstandes (Pliquett et al., 2010)	9
Abbildung 5	Das Singer-Nicolson-Modell der Zellmembran (Singer und Nicolson, 1972).....	10
Abbildung 6	Die verschiedenen Dispersionen der Zellimpedanz im Bode-Diagramm (links) und anschaulich dargestellt an einer Modellzelle (rechts) (nach Pliquett, 1991)	12
Abbildung 7	Ersatzschaltbild einer Whole-Cell-Clamp Anordnung (nach Molleman A., 2002).....	14
Abbildung 8	Ersatzschaltbilder für ein Zwei- (A) und ein Vierelektrodensystem (B) (Barthel et al., 2012)	15
Abbildung 9	Ersatzschaltbild einer Zelle in der Nähe einer Elektrode	16
Abbildung 10	TiePie Handyscope HS5-530XM	17
Abbildung 11	HEKA EPC 10 Verstärker.....	18
Abbildung 12	Ersatzschaltbild des Voltage-Clamp Modus des HEKA EPC 10 Verstärkers.....	18
Abbildung 13	3D Ansicht des Pipettenhalters für die Mikroelektroden	19
Abbildung 14	Versuchsanordnung zur Einbettung der Mikroelektrode in Hartwachs	21
Abbildung 15	Goldelektrodenspitze direkt nach Auseinanderziehen der Glaskapillare (oben) und nach einem fünfminütigen Ätzzvorgang mit I/KI-Lösung (unten).....	23
Abbildung 16	Goldelektrodenspitze nach Elektroerosion	24
Abbildung 17	Kohlefaserelektrodenspitze nach Schleifen mit Diamantpapier. Die Länge des Balkens entspricht 10 μm	26
Abbildung 18	Stromantwort auf einen Spannungspuls (10 mV) der Kohlefaserelektrode vor (blau) und nach dem Kontakt mit einem mit Iridium besputterten Titanstift (grün)	27
Abbildung 19	Impedanzspektrum der Kohlefaserelektrode vor und beim Kontakt mit einer Zelle.....	28
Abbildung 20	Änderung des Widerstands der Kohlefaserelektrode beim Einstich in eine Luftblase	29
Abbildung 21	Spitze der Patchpipette für die Whole-Cell-Clamp Messungen.....	32
Abbildung 22	Aufzeichnung der Transmembranspannung von L929 Fibroblasten im Whole-Cell-Clamp Modus: Eine Hyperpolarisierung nach Gabe des Strompulses (1 s) konnte nicht beobachtet werden.	34
Abbildung 23	In PMMA eingebettete Kohlefaserelektrode.....	37
Abbildung 24	Aufsicht auf die in PMMA eingebettete Gold- (links) und Kohlefaserelektrode (rechts). Die Länge der weißen Balken entspricht 10 μm	37
Abbildung 25	Impedanzspektrum einer in PMMA eingebetteten Kohlefaserelektrode, die an den EPC 10 Verstärker angeschlossen wurde.	38
Abbildung 26	Spitze der Pipette, die zur Positionierung der Zelle auf die Mikroelektrode verwendet wurde. Die Länge des weißen Balkens entspricht 10 μm	39
Abbildung 27	Versuchsaufbau zur Impedanzspektroskopie: Rechts unter dem Monitor ist das TiePie Handyscope, das als Spannungsquelle diente, zusammen mit dem Netzteil zu sehen, welches das damit verbundene Frontend mit Spannung versorgte. Das Frontend diente dann als spannungsgesteuerte Stromquelle. An das Frontend wurde schließlich die Mikroelektrode angeschlossen (hier im Bild nicht zu sehen).....	40
Abbildung 28	Aufsicht auf eine Goldelektrode, die mit einer Zelle besetzt ist (Durchmesser der Elektrode: 35 μm).....	41
Abbildung 29	Impedanzspektren der in PMMA eingefassten Kohlefaserelektrode: Es konnte kein Unterschied zwischen einer blanken (blau) und einem mit einer Zelle besetzten Elektrode (lila) gemessen werden.	41
Abbildung 30	Profilbild der in PMMA eingefassten Kohlefaserelektrode mittels AFM	42
Abbildung 31	Impedanzspektren der in PMMA eingefassten Goldmikroelektrode	43

Abbildung 32	Phasenwinkel der in PMMA eingefassten Goldmikroelektrode	44
Abbildung 33	Impedanzspektren der verschiedenen PBS-Verdünnungen, gemessen mit der Goldmikroelektrode	47
Abbildung 34	Verlauf der Phasenwinkel der verschiedenen PBS-Verdünnungen, gemessen mit der Goldmikroelektrode	47
Abbildung 35	Ortskurven der Impedanzmessungen der verschiedenen PBS-Verdünnungen	48
Abbildung 36	Ersatzschaltung, die das untersuchte Elektrodensystem repräsentiert	48
Abbildung 37	Die Bode-Diagramme der gemessenen und simulierten Daten	50

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Ionenkonzentrationen des Zytosols und des Nährmediums und Permeabilitäten der einzelnen Ionensorten	34
Tabelle 2	Mit dem Leitfähigkeitsmessgerät gemessene Leitfähigkeiten für die verschiedenen PBS-Verdünnungen	46
Tabelle 3	Die durch die Simulation ermittelten Werte der Elemente des Ersatzschaltbildes zur Anpassung an die gemessenen Daten	49
Tabelle 4	Errechnete Streuwiderstände nach Formel (16)	51

Abkürzungen

CPE:	Konstantes Phasenelement
H.A.:	Hyperpolarisation activation
MUT:	Material under test (zu untersuchendes Material)
PBS:	Phosphate buffered saline

Konstanten

ϵ_0 :	elektrische Feldkonstante ($8,85 \cdot 10^{-12}$ F/m)
F:	Faradaykonstante (96485 K/mol)
R:	allgemeine Gaskonstante (8,314 J/mol*K)

Symbole

α :	Anodischer Durchtrittsfaktor
ϵ :	Permittivität
ϵ_r :	relative Permittivität eines Mediums im Verhältnis zum Vakuum
γ :	Aktivitätskoeffizient
κ :	Leitfähigkeit des Mediums
φ :	Phasenwinkel
$\Delta\varphi$:	Potentialänderung an der Elektrode
A:	Oberfläche
a:	Aktivität
C:	Kapazität
C_{dl} :	Doppelschichtkapazität
C_m :	Membrankapazität
$C_{pipette}$:	Pipettenkapazität
c_{ion} :	Konzentration einer bestimmten Ionensorte
d:	Dicke
d_{OH} :	Dicke der äußeren Helmholtzschicht
e:	Eulersche Zahl
f:	Frequenz
I:	Strom
i:	Stromdichte

i_0 :	Austauschstromdichte
I/KI:	Iod-Kaliumiodid
P_{ion} :	Permeabilität der Membran für eine bestimmte Ionensorte
R:	Widerstand
R_{access} :	Zugangswiderstand
R_{ct} :	Durchtrittswiderstand
R_{leak} :	Sealwiderstand
R_m :	Membranwiderstand
$R_{pipette}$:	Pipettenwiderstand
R_s :	Streuwiderstand
R_{Zyt} :	Zytoplasmawiderstand
r:	Radius
r_{ch} :	Radius der Messkammer
r_{el} :	Radius der Elektrode
T:	Temperatur
U:	Spannung
U_N :	Nernstspannung
U_M :	Transmembranspannung
X:	Blindwiderstand
x:	Länge
Z:	Impedanz
Z_{CPE} :	Impedanz eines konstanten Phasenelementes
Z_{El} :	Elektrodenimpedanz
Z_{ges} :	Gesamtimpedanz des Elektroden/Elektrolyt-Systems
z:	Valenz eines Ions

1 Einleitung

Die Impedanzspektroskopie hat sich im biologischen Bereich als eine nützliche Methode erwiesen, nichtinvasiv biologisches Material zu untersuchen. Beispielsweise kann damit in Zellsuspensionen der Zellgehalt bestimmt werden (Markx, Davey, 1999; Krommenhoek et al., 2006; Sabuncu et al., 2012). Mit der Erfindung des Coulter-Zählers 1949 ist es auch möglich, einzelne Zellen in einem fluidischen System zu zählen und zu erfassen, ohne dass diese auf irgendeine Weise markiert werden müssen. In dieser einfachen Konstruktion wurden zwei Gefäße, in denen sich jeweils eine Elektrode befand, durch eine sehr enge Öffnung miteinander verbunden. An die Elektroden wurde eine Spannung angelegt und der Strom zwischen beiden gemessen. Immer, wenn ein Partikel die Engstelle passierte, ergab sich eine Verringerung der gemessenen Stromstärke. Mit dieser Methode konnten auch schon, je nach Änderung der Stromstärke, Unterschiede in der Größe der vorbeiströmenden Partikel festgestellt werden. Diese Methode wurde im Laufe der Zeit schon so weit miniaturisiert, dass sie in Form eines mikrofluidischen Chips realisiert werden kann, was sie auch auf Grund ihres relativ einfachen apparativen Aufbaus für Transporte geeignet macht. Die Zellen müssen auch nicht, anders als beispielsweise bei der fluoreszenzbasierten Durchflusszytometrie, vor der Zählung gefärbt oder fluoreszenzmarkiert werden, was zusätzliche Materialien und Zeit einspart. Kombiniert man diese Methode nun mit einer Messung der Impedanz bei verschiedenen Frequenzen oder mit der Impedanzspektroskopie können elektrische Eigenschaften der einzelnen Zellen im Durchlaufverfahren sofort mitbestimmt werden, womit auch verschiedene Zelltypen unterschieden werden können, die sich nicht in ihrer Größe unterscheiden (Holmes et al., 2007; Cheung et al., 2010).

Der Elektrodendurchmesser in kommerziellen Chipsystemen liegt zwischen 30 μm und 50 μm . In dieser Arbeit wurden nun Elektroden aus Kohlefasern mit einem Durchmesser von 7 μm und einem Goldbonddraht mit einem Durchmesser von 35 μm hergestellt, um zu sehen, ob auch bei kleineren Elektrodenoberflächen einzelne Zellen erfasst werden können und auch bei einem gewissen Abstand zur Oberfläche, um die Situation in einem mikrofluidischen Kanal simulieren zu können. Damit soll für spätere Anwendungen ausgeschlossen werden, dass bei einer Messung zwei Zellen gleichzeitig erfasst werden. Des Weiteren wurde versucht, die passiv-elektrischen Zelleigenschaften, darunter die Membrankapazität, der einzelnen Zellen selbst quantitativ zu bestimmen. Bisher wurden Werte veröffentlicht, die teilweise erheblich voneinander abwichen. Pasqualotto et al. (2012) ermittelten bei ihren Impedanzmessungen für ihr Zellmodell eine Membrankapazität von 0,785 pF und Ngyen et al. (2013) 584 pF, obwohl diese im Bereich um 10 pF liegen sollte. Als Referenzmethode sollte die Patch-Clamp-Methode dienen, mit der Spannung und Ströme über die Membran direkt gemessen und damit deren passive Eigenschaften bestimmt werden kann. Damit sollten die im Zell-Elektroden-Modell ermittelten Werte abgesichert werden.

2 Theorie

2.1 Elektrische Grundlagen

2.1.1 Der Widerstand

Abhängig vom Material, das er durchfließt, wirkt dem Strom I von Ladungsträgern im einfachsten elektrischen Stromkreis ein Widerstand R mit der Einheit Ω entgegen. An diesem Widerstand fällt eine Spannung U ab (Abb. 1). Das bedeutet, es besteht zwischen beiden Enden dieses Widerstands eine Potentialdifferenz, entlang derer die Ladungsträger vorangetrieben werden. Der Widerstand bildet den Proportionalitätsfaktor zwischen Spannung und Strom:

$$U = R \times I \quad (1)$$

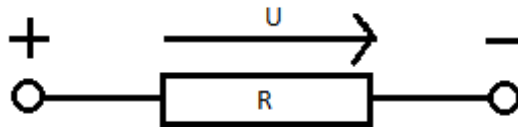


Abbildung 1 Schaltbild eines einzelnen Widerstandes

Werden mehrere Widerstände in Reihe geschaltet, addieren sich ihre Werte gemäß dem Kirchhoff'schen Gesetz zu einem Gesamtwiderstand:

$$R_{ges} = R_1 + R_2 + \dots + R_n \quad (2)$$

Sind sie parallel geschaltet, ist der reziproke Wert des Gesamtwiderstandes die Summe der reziproken Werte der Einzelwiderstände:

$$\frac{1}{R_{ges}} = \frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} + \dots + \frac{1}{R_n} \quad (3)$$

2.1.2 Der Kondensator

Im Prinzip besteht der Kondensator aus zwei parallel zueinander angeordneten Platten, die durch ein nichtleitendes Medium, Dielektrikum genannt, getrennt sind. Wird am Kondensator eine Spannung angelegt, wird dieser polarisiert, d. h. an den gegenüberliegenden Platten sammeln sich die jeweils entgegengesetzten Ladungen an. Dadurch entsteht zwischen den Platten ein elektrisches Feld, durch das diese Ladungen an den Platten gespeichert werden können (Abb. 2). Die Fähigkeit, diese Ladungen pro Spannungsstufe zu speichern, wird als Kapazität C bezeichnet.

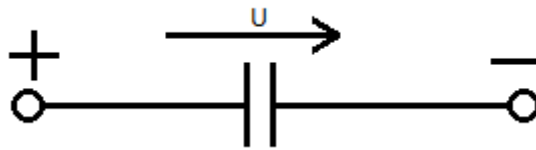


Abbildung 2 Schaltbild eines Kondensators

Die Kapazität eines einfachen Plattenkondensators hängt zum Einen von der Fläche der Platten A und deren Abstand d zueinander und zum Anderen von der Permittivität ϵ des Dielektrikums ab, das sich zwischen den Platten befindet. Die Permittivität mit der Einheit F/m wird als die Durchlässigkeit des Dielektrikums für elektrische Felder definiert und ist ein Maß für die Speicherfähigkeit für elektrische Energie. Sie setzt sich zusammen aus dem Produkt der relativen Permittivität eines Dielektrikums zu der des Vakuums ϵ_r und der elektrischen Feldkonstante ϵ_0 . Zusammen aus diesen Werten ergibt sich die Kapazität eines Kondensators nach folgender Formel:

$$C = \epsilon_r \epsilon_0 \frac{A}{d} \quad (4)$$

2.1.3 Der Blindwiderstand

Wegen des isolierenden Dielektrikums findet zwischen den Kondensatorplatten kein Nettoladungsträgertransport statt, weshalb man von einem imaginären Widerstand oder Blindwiderstand spricht. Es können jedoch im Dielektrikum Ladungen gegeneinander verschoben und auf diese Art elektrische Energie gespeichert werden. Man spricht hier vom Verschiebungsstrom. Bei sehr hohen Frequenzen f ist nicht genügend Zeit, um den Kondensator zu polarisieren, wodurch nur ein geringer Spannungsabfall verursacht wird. Bei niedrigen Frequenzen bis hin zum Gleichstrom werden die Kondensatorplatten geladen und es fließt kein elektrischer Strom durch das Dielektrikum, was einem hohen Widerstand entspricht. Der kapazitive Widerstand oder Blindwiderstand X ergibt sich daher aus folgender Formel:

$$X = -\frac{1}{2\pi fC} \quad (5)$$

Der Blindwiderstand ist also frequenzabhängig. Die Negativität von X erklärt sich daraus, dass bei einer sinusförmigen Wechselspannung der Scheitelwert der Spannung dann gegeben ist, wenn der Kondensator vollständig geladen ist. In diesem Moment fließt aber am Kondensator kein Strom. Erst, wenn der Kondensator entladen wird, fließt ein Strom, der dann maximal ist, wenn der Kondensator vollständig entladen ist, wenn also am Kondensator keine Spannung mehr anliegt. Dadurch ist der Strom um 90° im Verhältnis zur Spannung in negativer Richtung verschoben.

2.1.4 Die Impedanz

Sollen von einem Stromkreis dissipative und konservative (z. B. kapazitive) Widerstände miteinander verrechnet werden, benutzt man, um die Rechnung zu vereinfachen, das Konzept der komplexen Impedanz Z . Das bedeutet, die gesamte Impedanz wird wie eine komplexe Größe behandelt, bei der die dissipativen Elemente dem Realteil und die kapazitiven dem Imaginärteil entsprechen.

$$Z = R + jX \quad (6)$$

j ist die imaginäre Einheit, deren Quadrat -1 ist.

In der komplexen Zahlenebene kann die Impedanz auch noch durch andere Größen dargestellt werden, nämlich durch ihren Betrag $|Z|$ und den Phasenwinkel φ , der die Verschiebung des Stroms zur Spannung angibt:

$$Z = |Z|e^{j\varphi} \quad (7)$$

$|Z|$ wird dabei als Scheinwiderstand bezeichnet.

$$|Z| = \sqrt{R^2 + X^2} \quad (8)$$

2.2 Vorgänge an einer Metallelektrode in Kontakt mit einer Elektrolytlösung

- Durchtrittswiderstand R_{ct}

Kommt eine metallische Oberfläche mit einer Elektrolytlösung in Kontakt, so treten Kationen aus dem Verbund heraus und lassen Elektronen zurück (Abb. 3). Dieser Vorgang kann sich auch umkehren und die Kationen nehmen wieder Elektronen auf. Im elektrochemischen Gleichgewicht treten beide Vorgänge gleich häufig auf. Wird eine Spannung angelegt, treten entsprechend der Polarität der Spannung vermehrt Ionen in die Lösung über oder werden an der Elektrode reduziert. Dieser Vorgang benötigt eine Aktivierungsenergie. Beim Überwinden dieser Energiebarriere wirkt den Ladungsträgern ein Widerstand entgegen, der im Ersatzschaltbild durch den Durchtrittswiderstand repräsentiert wird (Robinson, 1968).

Die Stromdichte i , die beim Anlegen einer Spannung an der Elektrode auftritt, ist durch die Butler-Volmer-Gleichung (9) gegeben.

$$i = i_0 \left(e^{\frac{\alpha F \Delta \varphi}{RT}} - e^{-\frac{(1-\alpha) F \Delta \varphi}{RT}} \right) \quad (9)$$

α : Anodischer Durchtrittsfaktor

i_0 : Austauschstromdichte [A/cm^2]

$\Delta \varphi$: Potentialänderung an der Elektrode [V]

R : allgemeine Gaskonstante (8,314 J/mol*K)

T : Temperatur [K]

F : Faradaykonstante (96485 K/mol)

Bei kleinen Spannungen kann eine lineare Annäherung dieser Formel (Tafelgleichung) vorgenommen werden.

$$i = i_0 \frac{F \Delta \varphi}{RT} \quad (10)$$

Der Durchtrittswiderstand errechnet sich demnach aus:

$$R_{ct} = \frac{\Delta \varphi}{iA} = \frac{RT}{F i_0 A} \quad (11)$$

- Doppelschichtkapazität C_{dl}

Da sich an der Elektrodenoberfläche Metallkationen befinden, lagern sich auf Grund der elektrostatischen Anziehungskräfte Gegenionen aus der Elektrolytlösung an (Abb. 3). Diese aus beiden Ionen gebildete Schicht nennt sich Helmholtz-Schicht oder auch innere Stern-Schicht und verhält sich im elektrischen Wechselfeld wie ein Kondensator.

$$C_{dl} = \epsilon_r \epsilon_0 \frac{A}{d_{OHP}} \quad (12)$$

d_{OHP} : Dicke der äußeren Helmholtzschicht

Davor befindet sich noch durch die abnehmenden elektrostatischen Kräfte eine diffuse Schicht von Gegenionen, die als Gouy-Chapman-Schicht (Abb. 3) oder äußere Sternschicht bezeichnet wird. Die Dicke der Gouy-Chapman-Schicht ist durch die Debyelänge gegeben. Diese beläuft sich bei einer physiologischen Salzkonzentration (140 mM NaCl) auf etwas unter einem Nanometer. Bei Konzentrationen von 0,1 mM erstreckt sich diese auf 9,6 nm (Schmickler, 1996).

- Konstantphasenelement CPE

Die Doppelschichtkapazität zeigt in den meisten Fällen nicht das Verhalten eines reinen Kondensators. Deswegen muss in solchen Fällen ein Exponent n eingeführt werden, der die Abweichung vom idealen Verhalten wiedergibt. Der Blindwiderstand ergibt sich demnach aus

$$Z_{CPE} = \frac{1}{(j2\pi f)^n C} \quad (13)$$

Der Wert für n liegt zwischen 0 und 1. Für einen Wert von 0 verhält sich das System wie ein Wirkwiderstand, für einen Wert von 1 wie ein Kondensator. Der Parameter n hängt unter anderem von der Oberflächenrauigkeit, der Temperatur und darüber hinaus von der Stromdichte- und Potentialverteilung über der Elektrodenoberfläche ab (Jorcin et al., 2006). Da der Phasenwinkel für die Impedanz eines Systems, welches ein solches Element enthält, über

einen bestimmten Frequenzbereich konstant bleibt, nennt man dieses „Konstantphasenelement“ (CPE). Eine besondere Form des CPE ist die Warburg-Impedanz. Diese gibt das Verhalten von Diffusionsprozessen an der Elektrode wieder und spielt deswegen erst bei sehr geringen Frequenzen eine Rolle. Sie soll deswegen hier nicht weiter behandelt werden.

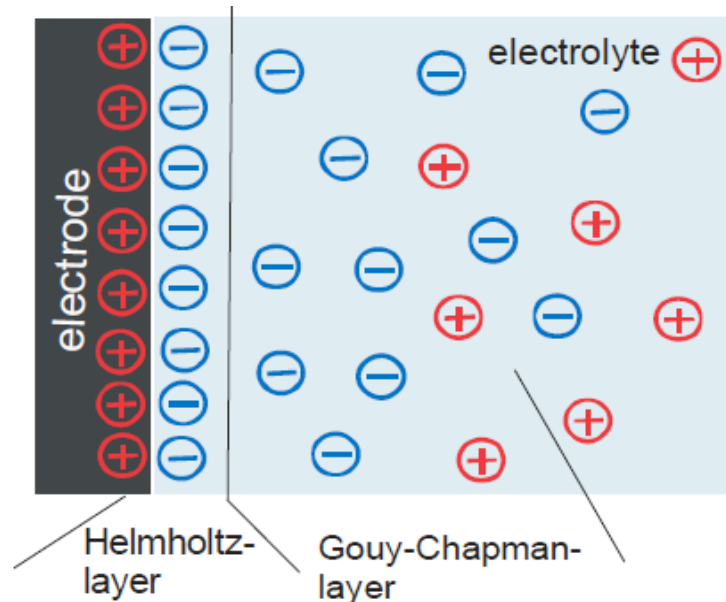


Abbildung 3 Schichten an einer Grenzfläche zwischen einem Metall und einem Elektrolyten (nach Pliquett et al., 2010)

- Streuwiderstand R_s

Bei miniaturisierten Elektroden muss noch ein weiteres Element mit einbezogen werden. Da sich durch die hohe Stromdichte an der Elektrodenoberfläche das elektrische Feld auch nur an dieser konzentriert, ergibt sich dadurch dort ein relativ hoher differentieller Widerstand bezogen auf eine Fläche um diese herum, der mit zunehmendem Abstand x von der Elektrodenoberfläche abnimmt (Pliquett et al., 2010). Unter der Annahme, dass der Widerstand, der von einer kreisrunden Plattenelektrode ausgeht, innerhalb unendlich dünner Halbkugeln konstant ist (Abb. 4), wäre der Wert des differentiellen Widerstands dR_s pro Streckenelement dx .

$$dR_s = \frac{dx}{2\pi\kappa x^2} \quad (14)$$

κ : Leitfähigkeit des Mediums

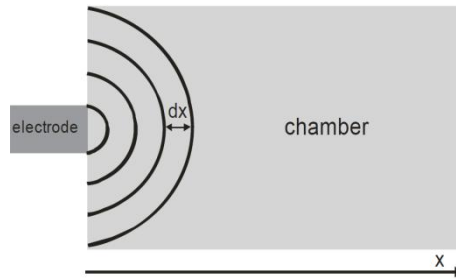


Abbildung 4 Ansatz zur Berechnung des Streuwiderstandes (Pliquett et al., 2010)

Um den gesamten Widerstand zu berechnen, muss dann über dx vom Radius der Messelektrode r_{el} zum Radius der Messkammer r_{ch} integriert werden.

$$R_S = \frac{1}{2\pi\kappa} \int_{r_{el}}^{r_{ch}} \frac{dx}{x^2} = \frac{1}{2\pi\kappa} \left(\frac{1}{r_{el}} - \frac{1}{r_{ch}} \right) \quad (15)$$

Ist $r_{ch} \gg r_{el}$, kann näherungsweise mit folgender Formel gerechnet werden (Pliquett et al., 2010):

$$R_S = \frac{1}{2\pi\kappa r_{el}} \quad (16)$$

2.3 Elektrische Eigenschaften der Zellmembran

Zellen werden durch eine Membran begrenzt, die aus einer Lipid-Doppelschicht besteht. Chemisch bestehen die einzelnen Elemente dieser Schicht aus zwei Fettsäureresten, die über eine Esterverbindung beispielsweise mit einem Glycerinalkohol verbunden sind. Die dritte Hydroxygruppe ist über einen Ester mit einer Phosphatgruppe, an der noch ein Cholinrest hängt, verbunden. Die hydrophoben Fettsäurereste lagern sich in der Doppellipidschicht zusammen. Im Singer-Nicholson Modell (1972) ragen durch diese Doppelschicht bedingt durch hydrophobe und hydrophile Wechselwirkungen integrale Proteine hindurch. Daneben gibt es noch periphere Proteine, die sich entweder direkt an die Oberfläche der Membran anlagern oder indirekt über integrale Proteine mit dieser verknüpft sind (Abb. 5).

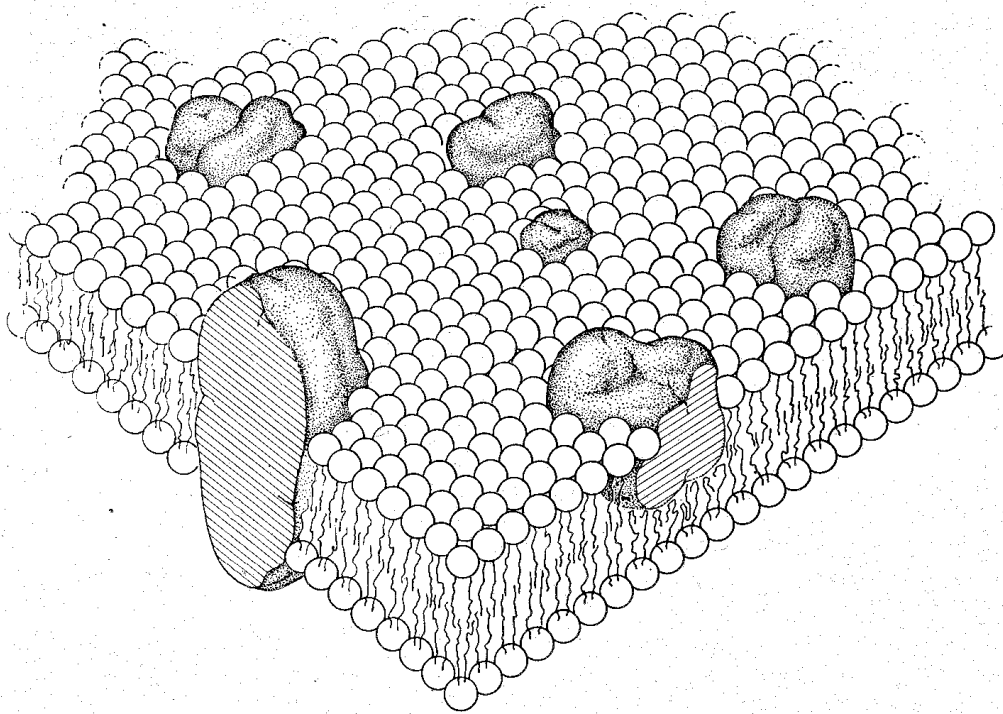


Abbildung 5 Das Singer-Nicolson Modell der Zellmembran (Singer und Nicolson, 1972)

2.3.1 Die Transmembranspannung

Da in der Lipid-Doppelschicht keinerlei freie elektrische Ladungsträger vorhanden sind, wirkt diese wie ein Isolator. Sie stellt damit eine Barriere für die Ionen auf beiden Seiten dar. Durch die unterschiedliche Verteilung der Ionen inner- und außerhalb der Zelle entsteht über die Membran eine Transmembranspannung U_M , umgangssprachlich Membranpotential genannt.

Im Zellinnern befinden sich relativ zum extrazellulären Raum sehr viele Kaliumionen, während umgekehrt Natriumionen in relativ höherer Konzentration im extrazellulären Raum gelöst sind. Auf Grund der ungleichen Verteilung der Ionen und der hohen Permeabilität der Membran für Kaliumionen können diese durch sogenannte Sickerkanäle, also porenartige Transmembranproteine, entlang des chemischen Gradienten nach außen fließen. Dadurch wird das Zellinnere gegenüber dem extrazellulären Raum negativ geladen und es entsteht ein elektrisches Potential, das dem Ausstrom der Kaliumionen entgegenwirkt. Im Gleichgewichtszustand heben sich die Ströme nach innen und außen auf. Dieser Zustand wird durch die Nernstspannung U_N beschrieben.

$$U_N = -\frac{RT}{zF} \ln \frac{a_{K^+}^a}{a_{K^+}^i} \quad (17)$$

a_{K^+} : Aktivität des Kaliumions [mol/l]

z : Valenz des Kaliumions

Bei der Aktivität handelt es sich um das Produkt der Konzentration einer Ionensorte mit ihrem jeweiligen Aktivitätskoeffizienten γ . Dieser ist ein dimensionsloser Faktor und gibt das reale Verhalten von Ionen in konzentrierten Lösungen wieder, in denen es zu Wechselwirkungen zwischen den Ionen kommen kann.

Die Zellmembran ist aber auch geringfügig für andere Ionensorten permeabel. Deswegen wird die Transmembranspannung besser durch die Goldman-Gleichung beschrieben:

$$U_M = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_{K^+} c_{K^+}^a + P_{Na^+} c_{Na^+}^a + P_{Cl^-} c_{Cl^-}^i}{P_{K^+} c_{K^+}^i + P_{Na^+} c_{Na^+}^i + P_{Cl^-} c_{Cl^-}^a} \quad (18)$$

P_{ion} : Permeabilität der Membran für eine bestimmte Ionensorte [m/s]

c_{ion} : Konzentration einer bestimmten Ionensorte [mol/l]

Da sich auf Grund der Permeabilität für verschiedene Ionensorten die Ladungen auf beiden Seiten der Membran nach einiger Zeit ausgleichen sollten und damit die Transmembranspannung gegen 0 V gehen müsste, wird angenommen, dass eine Na^+/K^+ -Pumpe durch eine gekoppelte Dissoziation von ATP permanent Natrium aus der Zelle heraus und Kalium in diese hinein pumpt.

2.3.2 Passive elektrische Eigenschaften der Membran

Die passiven elektrischen Eigenschaften von Zellen im elektrischen Wechselfeld ändern sich über einen Bereich zwischen Hz und GHz in drei charakteristischen Schritten, was im Bode-Diagramm (Abb. 6) gut sichtbar ist. Diese Schritte werden α -, β - und γ -Dispersion genannt (Schwan, 1957). Diesen Stufen liegen folgende Mechanismen zu Grunde (Schwan, 1994):

- α -Dispersion (<100 kHz)

Die α -Dispersion wird durch das Zusammenspiel von Ladungen an der Oberfläche der Membran zwischen geladenen Bereichen von Membranproteinen und der hydrophilen Kopfgruppen der Phospholipidschicht und deren Gegenionen des Mediums verursacht.

- β -Dispersion (100 kHz – 10 MHz)

Bei höheren Frequenzen durchdringt das elektrische Feld die Zelle wegen des abnehmenden kapazitiven Widerstandes der Zellmembran. Durch den Umstand, dass die Membran von leitfähigem Medium umgeben ist, wirkt sie im elektrischen Wechselfeld wie ein Kondensator. Ihre spezifische Kapazität liegt bei etwa $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$.

Die Zelle kann auf Grund dieser Eigenschaften im elektrischen Feld durch ein Ersatzschaltbild repräsentiert werden, das sich aus einer Impedanz der Zelle Z_c , bestehend aus einer Reihenschaltung der Membrankapazität mit dem Widerstand des intrazellulären Mediums R_i und einem dazu parallel geschalteten Widerstand des extrazellulären Mediums R_o zusammensetzt.

- γ -Dispersion (100 MHz – 10 GHz)

Bei sehr hohen Frequenzen bis in den GHz-Bereich hinein können induzierte und permanente Dipole dem elektrischen Wechselfeld nicht mehr folgen, womit fast die ganze Energiespeicherfähigkeit verloren geht.

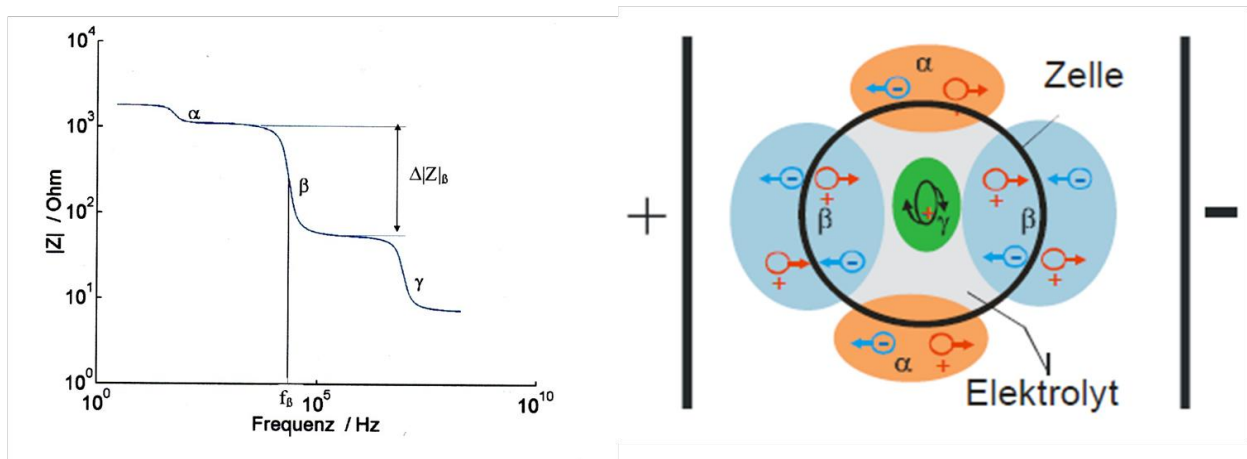


Abbildung 6 Die verschiedenen Dispersionen der Zellimpedanz im Bode-Diagramm (links) und anschaulich dargestellt an einer Modellzelle (rechts) (nach Pliquett, 1991)

2.4 Messmethoden

2.4.1 Patch-Clamp

Seit der Entwicklung der Patch-Clamp-Methode durch Neher und Sackmann 1976 konnten erstmals die Ströme einzelner Ionenkanäle gemessen werden. Dies konnte dadurch realisiert werden, dass ein kleiner Membranfleck durch die Öffnung einer abgerundeten Pipettenspitze von der Umgebung isoliert wurde. Diese Technik wurde derart weiterentwickelt, dass nur noch eine Pipette zur Vorgabe der Transmembranspannung und der Aufnahme der Ströme gebraucht wurde und das Hintergrundrauschen minimiert werden konnte (Hamill et al., 1981). Dadurch konnte diese Technik auch für die Whole-Cell-Clamp Messungen an kleinen Zellen verwendet werden, bei der dieser Membranfleck durchbrochen wird, was im Vergleich zu spitzen Intrazellulärelektroden zudem den Vorteil hat, dass der Eingangswiderstand gering und stabil ist.

Man verwendet für die Patch-Clamp-Technik eine feine Glaskapillare, die in der Mitte geschmolzen und auseinandergezogen wird, so dass sich stumpfe Enden mit einer Öffnung von 1 μm bis 2 μm bilden. Die Pipette wird dann mit einer Elektrolytlösung befüllt. Um den Elektrolyten an die Messelektronik zu koppeln, wird in diese eine Silber/Silberchlorid-Elektrode getaucht, die an einen Verstärker angeschlossen ist. Als Referenzelektrode dient ebenfalls eine Silber/Silberchlorid-Elektrode, die in das Medium getaucht wird, in der sich die Zellen befinden. Mittels kleiner Spannungspulse und der darauf folgenden Stromantwort kann der Widerstand der Pipette errechnet werden. Bringt man die Pipette in die Nähe der Membran und wirkt auf die Pipette ein Unterdruck, so kann eine Erhöhung des Widerstandes festgestellt werden, die im Gigaohm-Bereich liegt. Es hat sich dann ein sogenanntes Gigaseal gebildet. Das bedeutet, dass die Zellmembran die Pipette verschließt. Der Abstand zwischen dem Glas der Pipettenspitze und der Membran beträgt im Idealfall weniger als 1 nm, wodurch der hohe Widerstand verursacht wird. Wird ein weiterer Unterdruck auf die Pipette ausgeübt, kann die Zellmembran an der Pipettenspitze aufgebrochen werden, so dass man direkten Zugang zum Zellinneren erhält. Der Widerstand an der Pipettenöffnung wird als Zugangswiderstand bezeichnet, der bei diesen Anordnungen meist zwischen 3 M Ω und 20 M Ω beträgt. Der Strom fließt dann von der Pipette über die Öffnung und die Membran an die Referenzelektrode. Das ganze System kann durch folgendes Schaltbild repräsentiert werden (Abb. 7).

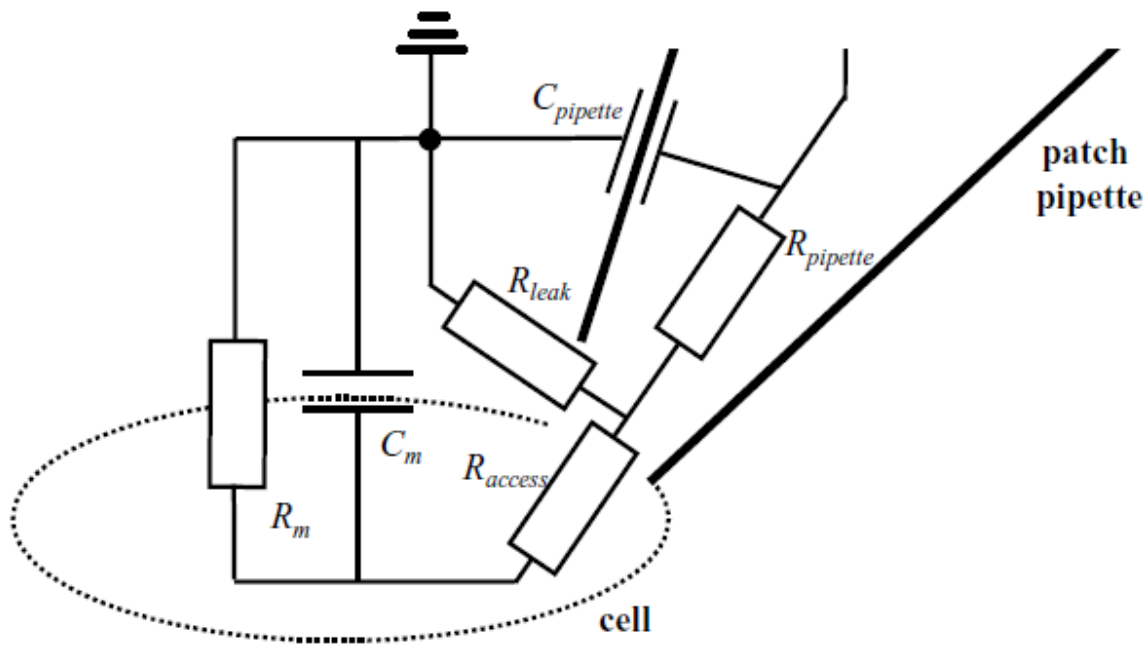


Abbildung 7 Ersatzschaltbild einer Whole-Cell-Clamp Anordnung (nach Molleman A., 2002)

Der Widerstand der Pipette ist in Reihe mit dem Zugangswiderstand und dem Membranwiderstand und letzterer mit der Membrankapazität parallel geschaltet. Zwischen Pipettenspitze und Membran kann eine kleine Lücke bestehen, deren Durchlässigkeit für Ionen durch den Sealwiderstand, der parallel zum Pipettenwiderstand geschaltet ist, repräsentiert wird. Hinzu kommt noch die Kapazität der Pipettenwand, die als Dielektrikum von Elektrolytlösungen umgeben ist, und somit als Kondensator wirkt. Die Kapazität der Pipette beträgt meist um die 6 pF.

2.4.2 Impedanzspektroskopie

An ein zu untersuchendes System, das auch als „material under test“ (MUT) bezeichnet wird, wird über ein Elektrodensystem eine Wechselspannung oder -strom angelegt und die entsprechende Strom- oder Spannungsantwort gemessen. Daraus kann die Impedanz bei einzelnen Frequenzen bestimmt werden. Es gibt aber auch noch die Möglichkeit, ein breitbandiges Signal, bspw. in Form eines Rechteckpulses oder weißen Rauschens, anzulegen und dann mittels Fouriertransformation das Antwortsignal in seine spektralen Frequenzanteile zu analysieren. Die Auswertung erfolgt über ein Bode-Diagramm, in dem der Betrag der Impedanz und die Phasenverschiebung gegen die Frequenz aufgetragen werden, wobei sich Blindwiderstände als Stufen in der doppelt-logarithmischen Auftragung bemerkbar machen,

oder mit einem Nyquist-Diagramm, in dem Imaginär- und Realteil der Impedanz dargestellt sind. Die Verläufe der Kurven können beispielsweise durch ein Ersatzschaltbild des zu untersuchenden Systems erklärt werden. Dabei werden die elektrischen Eigenschaften der Elektrode durch einen Widerstand, dem Durchtrittswiderstand, modelliert der meist parallel zu einem Konstantphasenelement geschaltet ist, welches die Doppelschichtkapazität repräsentiert. Die oberflächenbezogene Kapazität für Metallelektroden liegt zwischen $0,1 \text{ F/m}^2$ und $0,5 \text{ F/m}^2$ (Abdur Rahman et al., 2007). Andere Quellen geben einen ähnlichen Wert zwischen $5 \text{ } \mu\text{F/cm}^2$ und $50 \text{ } \mu\text{F/cm}^2$ an (Hamann und Vielstich, 2005). Bei Messungen im niederfrequenten Bereich kann der Einfluss der Elektrodenpolarisation/Doppelschichtkapazität störend wirken, weshalb man in diesem Fall auch ein weiteres Elektrodenpaar zur Signalmessung an das MUT anlegen kann, um diesen Einfluss zu minimieren (Barthel et al., 2012). Bei Messungen im höherfrequenten Bereich ist aber ein Zweielektrodensystem ausreichend (Abb. 8).

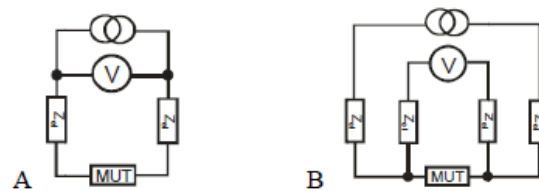


Abbildung 8 Ersatzschaltbilder für ein Zwei- (A) und ein Vierelektrodensystem (B) (Barthel et al., 2012)

Handelt es sich beim MUT um eine Elektrolytlösung, kann diese durch einen Widerstand entsprechend der Leitfähigkeit des Mediums modelliert werden. Da bei miniaturisierten Elektroden durch die hohe Feldstärke in der unmittelbaren Nähe der Elektrodenoberfläche ein sehr starker Spannungsabfall auftritt (vor allem wenn sich die Gegenelektrode in großer Distanz zur Arbeitselektrode befindet), werden Objekte, die sich in größerer Distanz zur Elektrodenoberfläche befinden, nicht erfasst. Es kann daher vorkommen, dass das interessierende Objekt ebenfalls nicht ganz erfasst wird (Barthel et al., 2012). Bei höheren Frequenzen geht der Einfluss der Elektrodenpolarisation zurück und es können die Blindwiderstände kleinerer Kapazitäten wie z. B. die einer Zellmembran gemessen werden. Abb. 9 zeigt das Ersatzschaltbild einer Zelle in der Nähe einer Elektrode. Die Membrankapazität C_m ist dabei mit dem Widerstand des Cytoplasmas R_{zyt} in Reihe geschaltet. Die sich daraus ergebende Impedanz der Zelle ist wiederum mit dem Widerstand des Elektrolyten bzw. dem Streuwiderstand R_s parallel geschaltet.

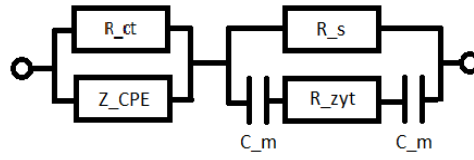


Abbildung 9 Ersatzschaltbild einer Zelle in der Nähe einer Elektrode

3 In Quarzglas eingebettete Elektroden

3.1 Vorüberlegungen

Die erste Idee war, dass man einen 35 μm dicken Bonddraht aus Gold und eine Kohlefaser mit einem Durchmesser von etwa 5 - 7 μm in eine Mikropipette einschmilzt und die Spitzen so geschliffen und poliert werden, dass nur eine ebene Oberfläche mit den Zellen in Kontakt kommt. Auf der anderen Seite der Mikropipette sollte ein verzinnter Kupferdraht eingeführt werden. Dasjenige Ende des Kupferdrahtes, welches eingeführt wurde, wurde mit Silberleitlack bestrichen, so dass schließlich dieser Draht nach Trocknen des Silberleitlacks mit dem Goldfaden bzw. mit der Kohlefaser kontaktiert war. Die auf diese Weise hergestellte Mikroelektrode sollte dann in einem Pipettenhalter fixiert werden, der am einen Ende über einen BNC-Stecker an einen der beiden Verstärker der EPC 10 Patch-Clamp-Anlage (HEKA, Elektronik Dr. Schulze GmbH, Ludwigshafen) angeschlossen werden kann, so dass theoretisch eine gleichzeitige Messung über die Glas- und über die Gold- bzw. Kohlefaserelektrode möglich wäre.

3.1.1 Spannungsquelle und Verstärker

An den EPC 10-Verstärker der HEKA Patch-Clamp-Anlage konnte für Impedanzmessungen eine externe Spannungsquelle angeschlossen werden. Dafür wurde das Handyscope HS5-530XM (TiePie engineering, Sneek) verwendet. Dessen Ausgang (AWG) wurde mit dem Spannungseingang (EXTERNAL STIM. INPUT VC) des EPC 10 verbunden und der Stromausgang des Verstärkers (CURRENT MONITOR, FILTER 1) mit dem Stromeingang des Handyscopes (CH1). Das gleiche galt für die Spannungsein- und -ausgänge (VOLTAGE MONITOR, CH2) (Abb 10, 11).



Abbildung 10 TiePie Handyscope HS5-530XM₁

¹ http://static.tiepie.com/gfx/Products/HS5/Handyscope_HS5.png (28.05.2015, 00:01)



Abbildung 11 HEKA EPC 10 Verstärker₂

Über ein mit MATLAB (The MathWorks Inc., Natick) geschriebenes Programm wurde das Handyscope gesteuert und die Daten verarbeitet. Es wurde bei den Messungen ein Multisinussignal mit einer Amplitude von 10 mV verwendet, bei dem 20 Frequenzen im Bereich zwischen 10 Hz und 30 kHz ausgesendet wurden. Als Messwiderstand zur Bestimmung des aufgenommenen Stromes diente der Rückkopplungswiderstand des Voltage-Clamp-Schaltkreises (Abb. 12) und wurde entsprechend der Verstärkerstufe dem Programm mitgeteilt.

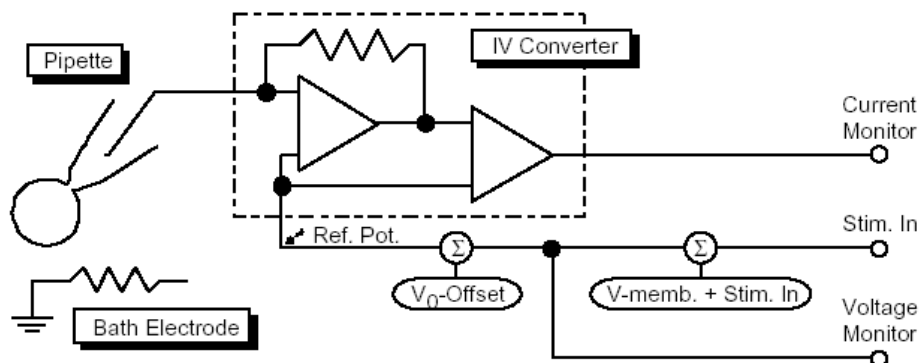


Abbildung 12 Ersatzschaltbild des Voltage-Clamp Modus des HEKA EPC 10 Verstärkers₃

₂ HEKA, EPC 10/EPC 10 USB, Patch Clamp Amplifier, Manual 2.3, S. 2

₃ HEKA, EPC 10/EPC 10 USB, Patch Clamp Amplifier, Manual 2.3, S. 59

3.1.2 Der Pipettenhalter

Ein Pipettenhalter wurde eigens mit dem Konstruktionsprogramm Inventor (Autodesk Inc., San Rafael) entworfen und von der Werkstatt des IBA angefertigt. Der Pipettenhalter ist im Prinzip ein 45,9 mm langer Zylinder, durch den hindurch eine 1,5 mm dicke Bohrung führt. Auf der einen Seite befindet sich eine 0,5 mm Vertiefung, in die ein O-Ring aus Gummi hineingelegt wird. Über dieses Ende wird eine Überwurfmutter geschraubt, so dass der O-Ring gequetscht wird und die Mikroelektrode, die von dieser Seite aus hinein geschoben wird, stabilisiert wird. An das andere Ende wird ein BNC-Stecker angeschraubt, an dessen Stift ein verzinnter Kupferdraht angelötet wurde. Entlang der Bohrung durch diesen Bolzen wurde zwischen den beiden Gewinden eine Öffnung mit 25 mm Länge und 2 mm Breite 4,8 mm tief hineingefräst, so dass die Bohrung in diesem Bereich freilag. Dadurch konnten die beiden Drähte, der eine ausgehend vom BNC-Stecker, der andere ausgehend von der Mikroelektrode, zusammengelötet werden (Abb 13).

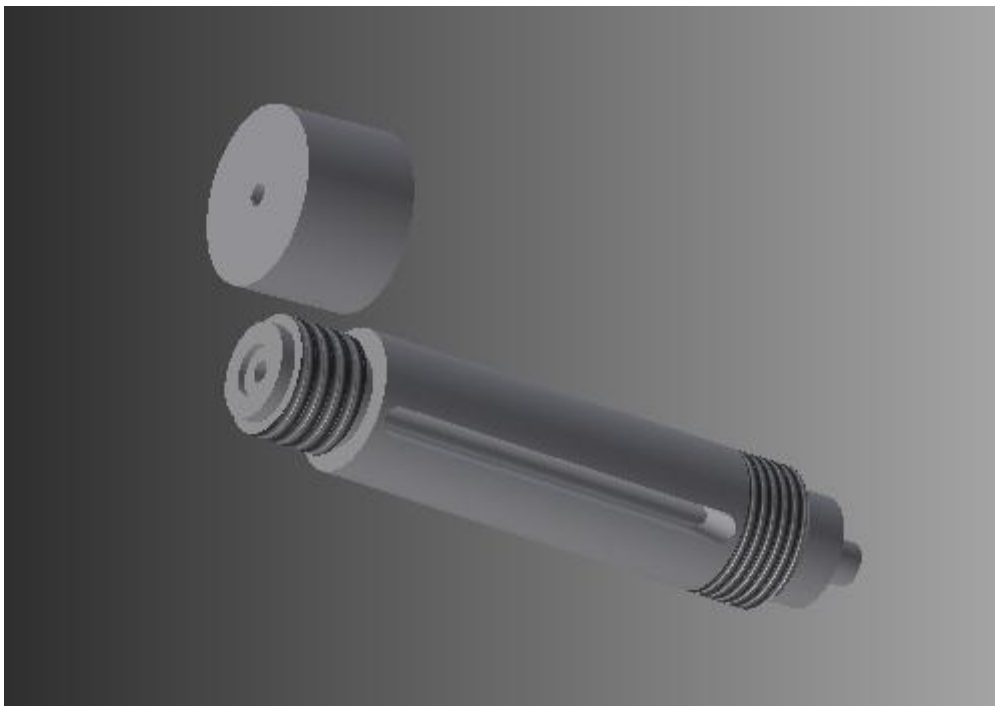


Abbildung 13 3D Ansicht des Pipettenhalters für die Mikroelektroden

3.2 Herstellung

3.2.1 Erste Versuche mit Goldbonddrähten

3.2.1.1 Einbetten in Hartwachs

Der Golddraht wurde in eine Kapillare eingeführt und diese dann mit dem Zeitz DMZ Puller mit dem Programm P(B) 12 (s. Anhang) auseinandergezogen, wobei aber zu beachten war, dass kein Borsilikatglas verwendet werden durfte, da sonst Goldatome beim Pipettenziehen in das Glas hinein diffundieren. Deswegen wurden hier Hämatokritröhrchen (Ilmglass, Ilmenau) verwendet.

Zuallererst muss die mit dem Pipettenzieher gezogene Elektrode möglichst genau vermessen werden. Ein Reagenzglas wurde bis zu einem Drittel mit geriebenem Hartwachs befüllt. Das Reagenzglas wurde an ein Stativ mit einer Klammer angebracht. Darüber wurde die Elektrode montiert. Um diese mit dem Stativ verbinden zu können, wurde die Elektrode in ein Stück Silikonschlauch eingeführt, welcher wiederum in das dickere Ende einer Pasteurpipette gesteckt wurde. Die Pasteurpipette wurde dann mit einer Stativklammer über dem Reagenzglas angebracht, so dass die Rotationsachsen des Reagenzglases und der Elektrode parallel zueinander standen. Unter dem Reagenzglas wurde auf einen Magnetrührer mit Heizung ein Becherglas gestellt, welches zuvor zu drei Vierteln mit Silikonöl befüllt wurde. Zur Vermeidung von Temperaturgradienten wurde das Silikonöl mit einem Rührfisch gerührt. Das Reagenzglas wurde soweit in das Ölbad eingelassen, dass der Rand der Befüllung mit Hartwachs mit dem Spiegel des Ölbad zur Deckung kam. Das Silikonöl wurde unter ständigem Rühren größtmöglich erhitzt (in diesem Fall 130 °C bis 140 °C). Bei Silikonölen sollte darauf geachtet werden, dass die Temperatur 200 °C nicht übersteigt. Bis dahin ist das Hartwachs schon in den flüssigen Aggregatzustand übergegangen. Danach wurde die Elektrode vorsichtig in das Hartwachs eingelassen, fixiert und die Heizung abgestellt (Abb. 14). Nachdem das Hartwachs wieder in den festen Aggregatzustand übergegangen war, wurde die Stativklammer von der Pasteurpipette gelöst und diese gleichzeitig von der Elektrode abgezogen. Das Reagenzglas wurde dann aus dem Ölbad herausgehoben.

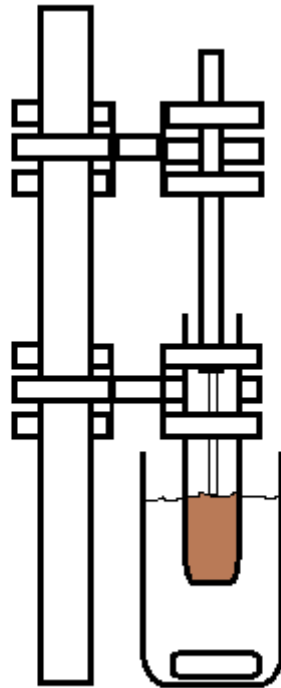


Abbildung 14 Versuchsanordnung zur Einbettung der Mikroelektrode in Hartwachs

An der Stelle, an der die Spitze der Elektrode endete, wurde das Reagenzglas durchsägt. Das restliche Glas, das noch an dem Hartwachs haftete, wurde ebenfalls entfernt. Die abgesägte Fläche wurde dann mit grobem Schleifpapier aus Siliciumcarbid, das auf einem rotierenden Tisch befestigt war, solange geschliffen, bis die Oberfläche der Elektrode zu erkennen war. Danach wurde zu immer feiner werdendem Schleifpapier übergegangen, bis der Poliervorgang am Schluss mit einem mit Diamantsuspension getränkten Poliervlies abgeschlossen wurde.

Um das Hartwachs wieder von der Elektrode zu lösen, wurde das Stück Hartwachs mit der Elektrode in ein weiteres Reagenzglas gesteckt, die Elektrode und das Reagenzglas wie oben beschrieben mit dem Stativ verbunden und das Reagenzglas wieder in das Silikonölbad gebracht. Das Ölbad wurde erneut erhitzt bis das Hartwachs wieder flüssig wurde. Die Elektrode wurde dann vorsichtig aus dem Wachs gezogen. Um nun restliches, an der Elektrode haftendes Wachs von der Elektrode zu entfernen, wurde das Reagenzglas vom Stativständer entfernt und das Silikonöl gegen handelsübliches Rapsöl ausgetauscht. Die blanke Elektrode wurde schließlich erneut in das Ölbad getaucht und das Rapsöl unter starkem Rühren erhitzt bis sich alles Hartwachs von der Elektrode löste.

Theoretisch hätte diese Herstellungsmethode gut funktionieren sollen, in der Praxis stellte sie sich jedoch deutlich schwieriger dar. Beim Schleifen wurde ständig unter dem Mikroskop überprüft, ob die Elektrodenspitze bereits erreicht wurde. Jedoch schoss bei jedem Versuch ab einem bestimmten Punkt das Wasser, das während des Schleifens über das Schleifpapier lief, am oberen Ende der Glaskapillare wieder heraus, ohne dass die Elektrodenspitze vorher gesichtet werden konnte. Das heißt, es wurde bereits der Teil der Kapillare erreicht, an dem sich das Glas vom Golddraht löste. Das könnte dadurch erklärt werden, dass beim Eintauchen der Elektrode in das flüssige Hartwachs die Elektrode möglicherweise einen Bruch erlitt und geknickt wurde.

Ein weiterer Nachteil dieser Methode ist, dass sie methodisch und zeitlich sehr aufwändig ist, vor allem, weil es sehr viel Zeit in Anspruch nimmt, bis sich das Hartwachs von der Elektrode gelöst hat. Insgesamt dauerte die Herstellung einer Elektrode einen ganzen Tag. Nach vier Versuchen wurden auf Grund des hohen Aufwandes keine weiteren mehr unternommen.

3.2.1.2 Ätzen mit Iod-Kaliumiodid-Lösung

Iod-Kaliumiodid ist eine gängige Substanz zum Ätzen von Gold. Da an gekrümmten oder spitzen Oberflächen die Oberfläche der Goldatome am ehesten frei liegt, sollte an diesen Stellen die Abtragungsrate am größten sein, was dazu führen würde, dass eine gekrümmte Oberfläche abgeflacht werden würde. Darum wurde versucht, die nach dem Pipettenziehen entstandenen kegeligen Spitzen der Goldelektroden durch Eintauchen in Iod-Kaliumiodidlösung abzutragen und eine plane Oberfläche an der Elektrodenspitze zu produzieren.

Abb. 15 zeigt eine Elektrodenspitze vor und nach einem fünfminütigen Ätzvorgang. Der Ätzvorgang führte nicht wie erhofft zu einer Einebnung der Spitzenoberfläche, sondern die Spitze blieb kegelig.

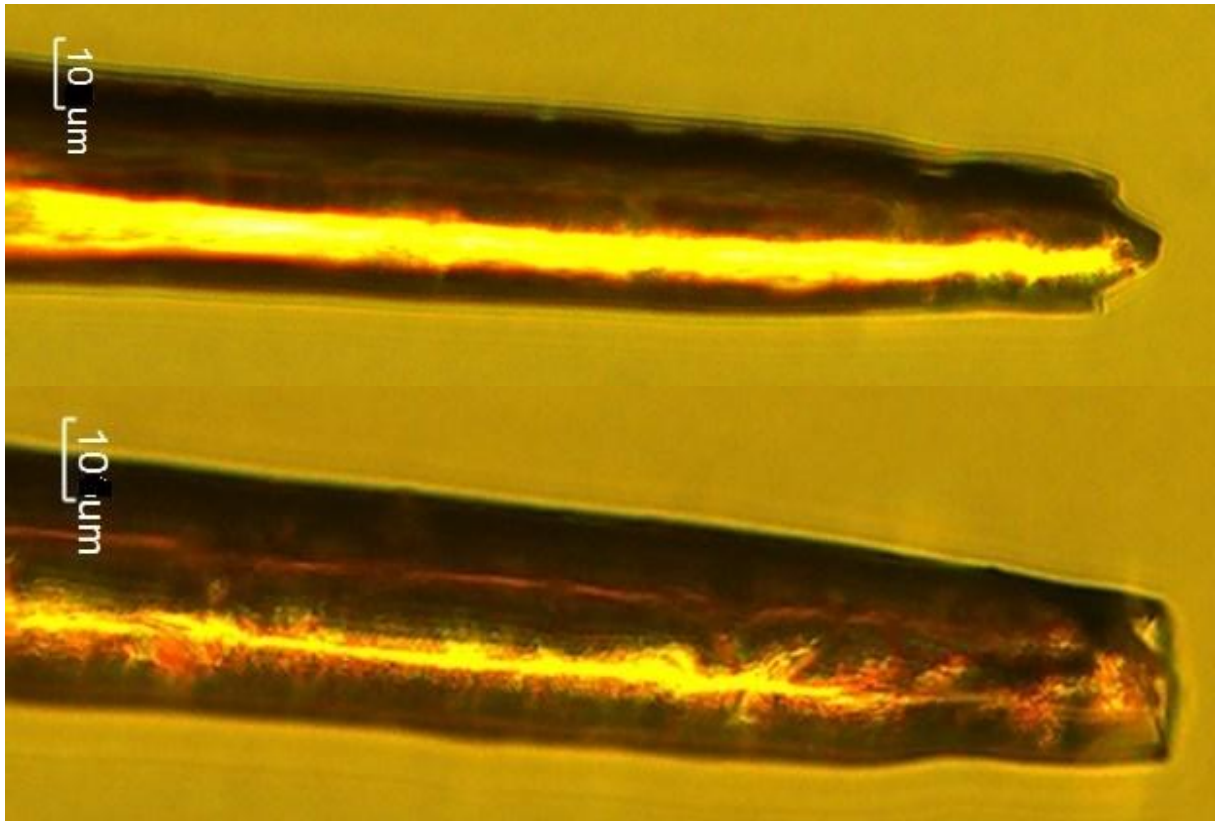


Abbildung 15 Goldelektrodenspitze direkt nach Auseinanderziehen der Glaskapillare (oben) und nach einem fünfminütigen Ätzvorgang mit I/KI-Lösung (unten)

3.2.1.3 Elektroerosion

Das Prinzip der Elektroerosion basiert auf der Verwendung der Goldelektrode als Anode in einer Galvanischen Zelle. Der Goldfaden in der Kapillare wurde mittels Silberleitlack mit einem Kupferdraht kontaktiert und dieser wiederum mit einer Krokodilklemme. Über eine Steckverbindung war diese an den Minuspol einer Spannungsquelle angeschlossen. Am Pluspol war ein einfaches Kupferkabel angeschlossen, dessen Ende einen Zentimeter abisoliert war und an dem ein einzelner Draht von den anderen separiert wurde. Das Kabel wurde mit einem Klebestreifen auf einem Objektträger unter einem Stereomikroskop fixiert. Das offene Ende der Glaskapillare, in die der Goldfaden eingeschmolzen wurde, wurde auf ein Stück Panasil (Kettenbach GmbH & Co. KG, Eschenburg), ein Abformmaterial, das normalerweise in der Zahntechnik verwendet wird, gelegt, so dass es erhöht positioniert war. Die Spitze der Kapillare wurde möglichst nahe an den abstehenden Kupferdraht gebracht. An dieser Stelle wurden einige Tropfen 0,9 %ige NaCl-Lösung auf den Objektträger getropft. Schließlich wurde die Spannung langsam erhöht und die Reaktion unter dem Mikroskop beobachtet. Es konnte festgestellt werden, dass die Erosion nicht an der vordersten Spitze begann, sondern dass die Erosion an den Seiten zu einer Art Kerbe verursachte, so dass, nachdem der Golddraht durchtrennt wurde, wieder eine kegelige Spitze übrig blieb (Abb. 16).

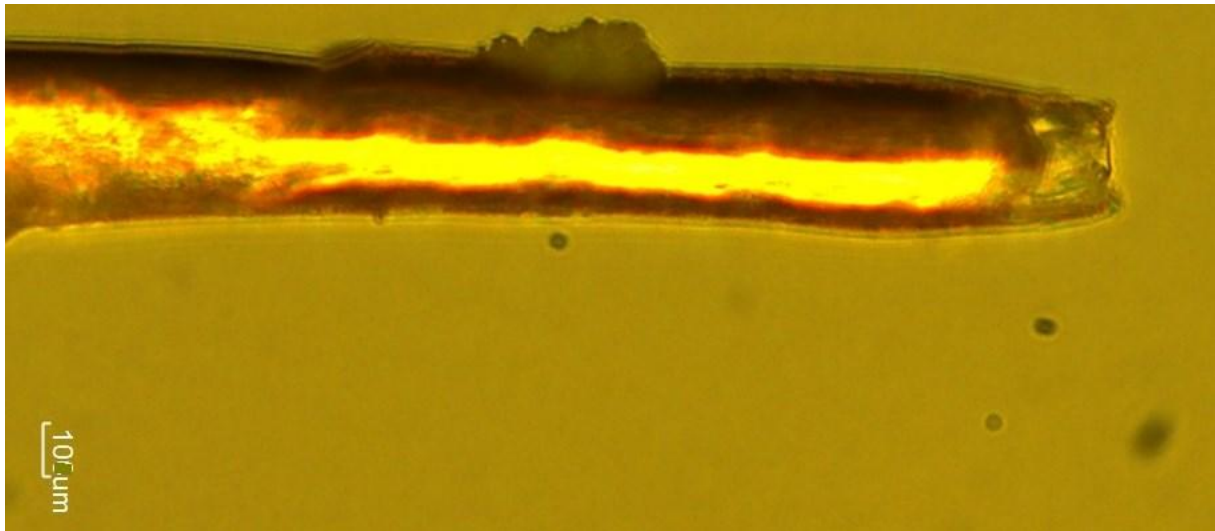


Abbildung 16 Goldelektrodenspitze nach Elektroerosion

3.2.2 Herstellung von Kohlefaserelektroden

3.2.2.1 Spezielle Vorkehrungen

Da sich Kohlefasern sehr leicht elektrostatisch aufladen und sich daher nicht einfach in die Glaskapillaren einführen lassen, weil sie am Glas haften bleiben, müssen für diese besondere Vorkehrungen getroffen werden. Entsprechend der Methodik von Millar und Pelling (2001) wurde ein Reagenzglas an einem Stativ befestigt, so dass es eine Neigung von etwa 10° aufwies. Dieses Reagenzglas wurde bis zum Rand mit Aceton befüllt und dann eine Einmal-Mikropipette (Brand GmbH & Co KG, Wertheim) so hineingelegt, dass ein Teil noch über den Rand des Reagenzglases hinaus ragte. Durch die Kapillarkräfte stieg das Aceton bei ausreichender Befüllung des Reagenzglases die Glaskapillare bis zum Ende hinauf. Um die Kohlefasern besser handhaben zu können, wurden vorher Nitril-Handschuhe angezogen. Eine einzelne Faser wurde dann mit der Hand aufgenommen und in die Glaskapillare eingeführt. Das aus dem Reagenzglas herausschauende Ende wurde dann zwischen Daumen und Mittelfinger eingeklemmt und der Zeigefinger gegen die Öffnung der Kapillare gedrückt, so dass die Kohlefaser beim Herausziehen der Kapillare nicht aus dieser heraus glitt. Damit das in der Kapillare übrig gebliebene Aceton aus dieser entfernt werden konnte, wurde sie senkrecht auf ein Tuch gestellt, welches das restliche Aceton aufsaugte.

Die mit der Kohlefaser bestückte Pipette wurde in den DMZ Puller (Zeitz Instruments GmbH, Martinsried) gelegt und mit dem Programm P (B) 12 (s. Anhang) auseinander gezogen. Meistens wurde die Kohlefaser dabei von den auseinander gezogenen Hälften der Kapillare eingefasst, also mussten die beiden Hälften durch einen Schnitt mit einem Skalpell getrennt werden.

3.2.2.2 Besprühen mit Urethan

Als eine Möglichkeit, den aus der Glaskapillare herausragenden Teil der Kohlefaser zu isolieren, wurde in Erwägung gezogen, die Spitze mit Urethan zu besprühen. Dabei bildeten sich aber Tröpfchen entlang der Kohlefaser, wobei der Bereich dazwischen nicht isoliert war. Dies wurde dadurch nachgewiesen, dass der Widerstand der Elektrode, der durch das Patchmaster-Programm mit Hilfe eines Testpulses berechnet wurde, beim Hineintauchen der Elektrode in eine vorgelegte Pufferlösung abnahm (nicht aufgezeichnet).

3.2.2.3 Schleifen mit Handbohrgerät

Darum wurde folgendermaßen vorgegangen: Unter dem Stereomikroskop wurde die Glaskapillare mit einem Stück Tesafilm (Bayersdorf AG, Hamburg) auf einem Objektträger fixiert. Mit einer Zange wurde dann die Kohlefaser so nah wie möglich an der Mündung des Glases durchtrennt. Dabei war es nicht wichtig, ob etwas vom Glas absplitterte.

Diamantpapier (Ocean Optics Inc., Dunedin) wurde kreisrund mit etwa den Abmessungen des Sägeblattes, welches für das MICROMOT Handbohrgerät (Proxxon GmbH, Föhren) vorlag, ausgeschnitten. In die Mitte wurde ein kleines Loch hinein geschnitten. Das Diamantpapier wurde auf das Sägeblatt gelegt und an den Werkzeugträger geschraubt. Das Handbohrgerät wurde in einem Schraubstock eingespannt, so dass das Sägeblatt senkrecht zum Boden positioniert war. Unter dem Stereomikroskop wurde dann das Sägeblatt mit Diamantpapier bei der geringsten Vergrößerung in den Fokus gebracht. Drei Petrischalen wurden übereinander gestapelt und die Elektrode oben aufgelegt, so dass die Spitze etwa 1 cm überstand. Die Spitze wurde mit Druck auf die Auflage in Richtung Diamantpapier geschoben, so dass sich die Spitze diesem näherte. Dies wurde bei steigender Vergrößerung des Mikroskops ausgeführt, bis die Spitze wenige μm von dem Diamantpapier entfernt war. Dann wurde das Handbohrgerät eingeschaltet und auf 500 rpm eingestellt. Die Spitze der Elektrode wurde nun, wie oben beschrieben, vorsichtig gegen das rotierende Diamantpapier gedrückt. Je nachdem, wie viel blanke Kohlefaser aus der Glaskapillare herausragte, musste die Spitze nun entsprechend lange geschliffen werden. Meistens blieben dabei Reste des Papiers an der Spitze. Diese konnten, so gut es ging, durch Abflammen entfernt werden (Abb. 17). Dazu konnte man die Spitze kurz in die Windung eines Heizdrahtes hineinhalten.

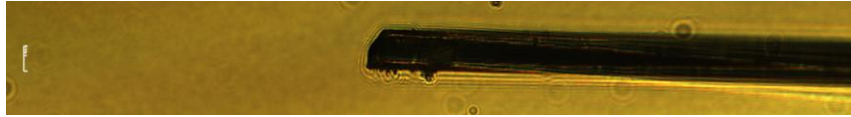


Abbildung 17 Kohlefaserelktrodenspitze nach Schleifen mit Diamantpapier. Die Länge des weißen Balkens entspricht 10 μm)

3.3 Erste Tests

3.3.1 Kontakt mit einem mit Iridium besputterten Titanstift

3.3.1.1 Versuchsaufbau

Der Strom wurde als Antwort auf einen Spannungspuls mit einer Amplitude von 10 mV mit der HEKA-Patchmaster-Software aufgenommen, einmal bevor die Kohlefaser mit einem mit Iridium besputterten Titanstift kontaktiert wurde und einmal, als es zum Kontakt kam. Dieser Versuch wurde durchgeführt, um zu testen, ob die Elektrode prinzipiell funktionierte. Der Platinstift wurde in eine Buchse gesteckt, die an einen Kupferdraht gelötet war und an dessen anderem Ende wiederum ein Stift angelötet war, um ihn an den Verstärker anzuschließen und so den Strom zu erden. Eine Petrischale wurde mit PBS (phosphate buffered saline) befüllt und der Titanstift in die Lösung eingetaucht. Die Elektrodenspitze wurde dann unter der Flüssigkeitsoberfläche an den Titanstift herangeführt.

3.3.1.2 Ergebnisse und Diskussion

Am Ende des Pulses betrug die Stromstärke 118,73 pA. Wird dieser Wert durch 10 mV entsprechend dem Ohmschen Gesetz (1) geteilt, ergibt dies einen Widerstand von 84,2 M Ω . Bei Kontakt mit dem Titanstift stieg die Stromstärke auf 714 nA, was einen Widerstand von 14 k Ω ergibt (Abb. 18).

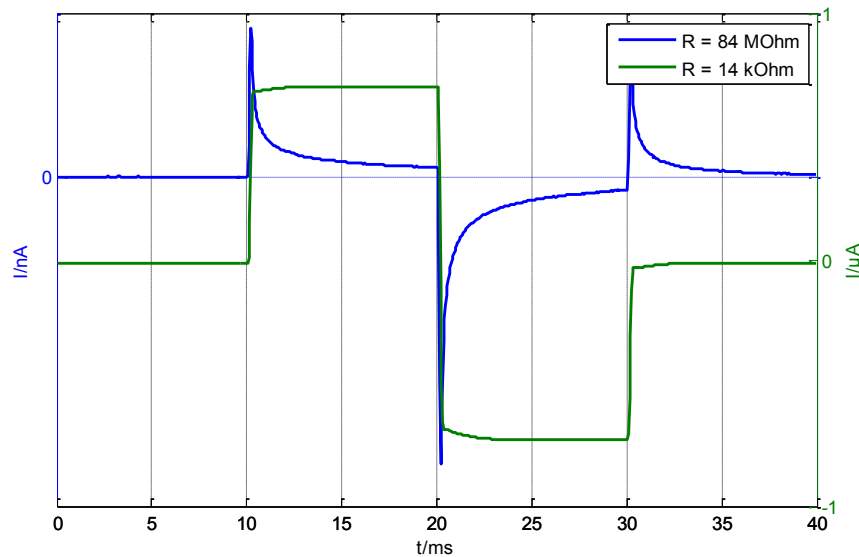


Abbildung 18 Stromantwort auf einen Spannungspuls (10 mV) der Kohlefaserelektrode vor (blau) und nach dem Kontakt mit einem mit Iridium besputterten Titanstift (grün)

Beim Heranfahren an den Titanstift sollte sich, da es sich bei Titan um einen Leiter handelt, der Widerstand verringern. Dies konnte jedoch über das Oszilloskopfenster der Pathmaster-Software nicht beobachtet werden, stattdessen verringerte sich der Widerstand erst beim Kontakt von 84 MΩ auf 14 kΩ. Immerhin verringerte er sich aber beim Kontakt. Daher durfte davon ausgegangen werden, dass die Elektrode prinzipiell funktionierte.

3.3.2 Heranfahren an eine Zelle

3.3.2.1 Versuchsaufbau

Ebenso müsste sich auf Grund des Streuwiderstandes der gemessene Widerstand erhöhen, wenn die Elektrode auf einen Isolator zubewegt wird. Um diesen Effekt zu testen, wurde eine Zelle verwendet, da deren Membran auf Grund ihrer Beweglichkeit etwas nachgeben kann, wenn die Elektrodenspitze diese erreicht. Die Kohlefaser wurde bei einer Distanz von 20 μm von der Zelle entfernt beginnend in 1 μm-Schritten an die Zelle herangefahren und es wurde bei jedem Schritt ein Spektrum aufgenommen.

Das Experiment wurde mit Fibroblasten der Linie L929 durchgeführt. Diese wurden in einer T25 Zellkulturflasche in eigens angesetzt Kulturmedium (DMEM, 20 mM Hepes, 2 mM Glutamin, 10 % foetales BSA, 1 % Penicillin/Streptomycin) in einem Inkubator bei einer Temperatur von 37 °C, einer Luftfeuchtigkeit von 85 % und einem CO₂-Gehalt von 5 % herangezogen.

3.3.2.2 Ergebnisse und Diskussion

Der Betrag der Impedanz fiel in der doppelt-logarithmischen Auftragung von 50 M Ω bei 10 Hz annähernd linear auf 400 k Ω bei 30 KHz ab. Beim Heranfahren an die Zelle ändert sich im Spektrum sowohl qualitativ als auch quantitativ nichts. Deswegen wurde in der folgenden Abbildung auch nur das Impedanzspektrum, das in einer Entfernung von 20 μ m von der Zelle und bei direktem Kontakt mit dieser aufgenommen wurde, angezeigt (Abb. 18).

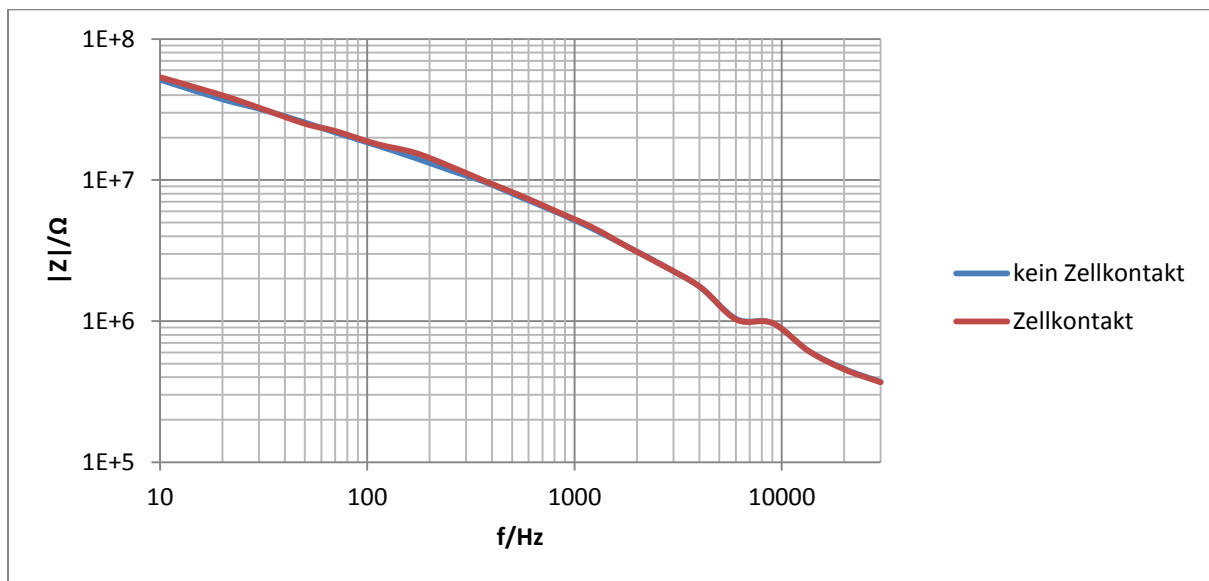


Abbildung 19 Impedanzspektrum der Kohlefaserelektrode vor und beim Kontakt mit einer Zelle

Diese Werte entsprechen in etwa denen der von Fox et al. gemachten Spektren (1980). Die Messungen wurden damals im selben Frequenzbereich vorgenommen. Der Betrag der Impedanz betrug etwa 50 M Ω bei 10 Hz und sank bis auf etwa 100 k Ω bei 10 kHz, wobei sich in der doppelt-logarithmischen Auftragung eine charakteristische s-förmige Kurve mit einer Steigung von etwa -1 zwischen 100 und 1000 Hz ergab, deren Steigung bei den darunter und darüber liegenden Frequenzen abflachte. Dies konnte bei vorher beschriebenen eigens durchgeführten Messungen mit der in Abb. 16 dargestellten Elektrode nicht beobachtet werden.

Des Weiteren konnte keine Änderung der Impedanz beim Heranfahren an die Zelle festgestellt werden. Selbst beim direkten Kontakt zeigte sich keine Erhöhung. Bei genauerer Betrachtung von Abb. 17 kann man erkennen, dass die Elektrodenoberfläche nicht ganz plan ist. Weiterhin könnten auch winzig kleine Risse im Glas gewesen sein, die möglicherweise unter dem Lichtmikroskop nicht zu erkennen waren, so dass der Strom nicht über die Zelle zur Elektrode floss, sondern über seitliche Pfade.

3.3.3 Einstich in eine Luftblase

3.3.3.1 Versuchsaufbau

Um die Vermutung zu testen, dass sich im um die Kohlefaser herum befindlichen Glas kleine Risse verbargen, wurde die Elektrode an eine Luftblase herangefahren, was insofern von Vorteil war, als die Oberfläche auf Grund der Oberflächenspannung bei Kontakt mit der Elektrodenspitze sich gut an deren Oberfläche anschmiegen sollte. In die Luftblase wurde so weit wie möglich hineingestochen. Bei jedem Mikrometer, den sich die Elektrodenspitze diagonal nach vorne bewegt hat, wurde am Oszilloskopfenster der Patch-Master-Software mit Hilfe des Testpulses der Widerstand abgelesen und notiert. Dabei steht die Position 0 für die Stelle, an der die Luftblase noch nicht berührt wurde.

3.3.3.2 Ergebnisse und Diskussion

Über die ersten 30 μm bleibt der Widerstand der Elektrode annähernd konstant bei 54 $\text{M}\Omega$, dann steigt er linear über die nächsten 110 μm auf 173 $\text{M}\Omega$ an (Abb. 20).

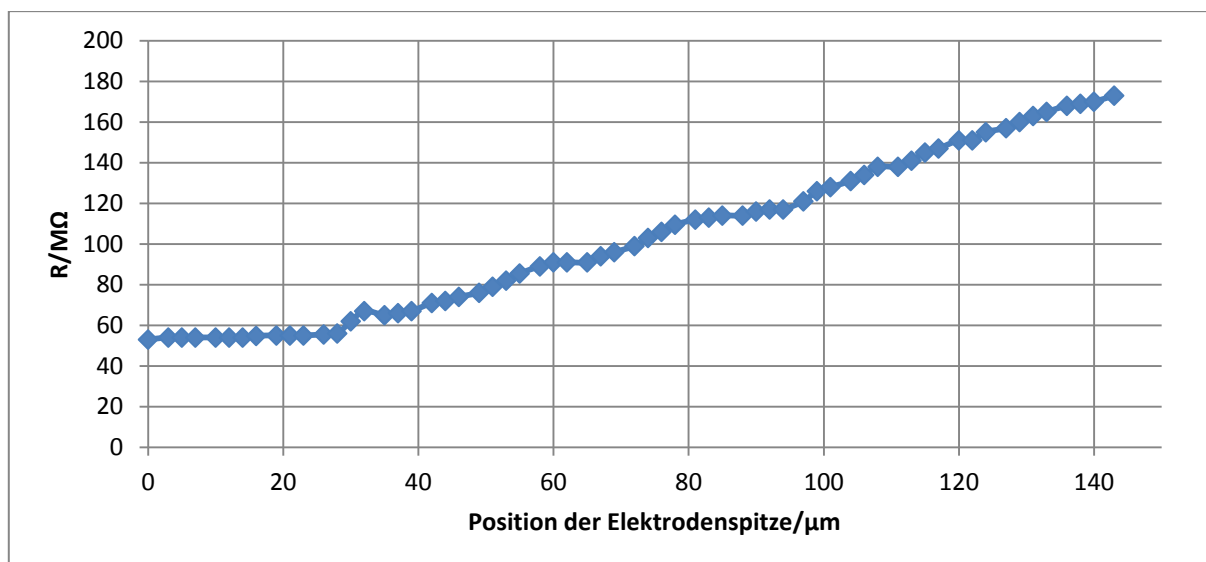


Abbildung 20 Änderung des Widerstands der Kohlefaserelektrode beim Einstich in eine Luftblase

Die Beobachtungen könnten dadurch erklärt werden, dass wegen der Oberflächenspannung des Wassers die Oberfläche der Luftblase dem Druck durch die Elektroden spitze etwas nachgab. Als dann die Luftblase penetriert wurde, stieg der Widerstand linear mit zunehmender Eindringtiefe. Wäre die Kohlefaser bis zur Spitze hin gut durch das Glas isoliert gewesen, hätte sich nach Eindringen der Spitze an der Umgebung der Spitze nicht mehr viel ändern sollen. Dass der Widerstand dennoch stieg, könnte vielleicht daran liegen, dass sich möglicherweise winzige Risse im Glas befanden, die unter dem Mikroskop nicht zu erkennen waren. Mit zunehmender Isolierung der Faser könnte bei zunehmender Eindringtiefe durch die sie umgebende Luft der Widerstand steigen. Eine weitere Erklärung könnte ein dünner Wasserfilm sein, der sich entlang der Glasoberfläche beim Einstechen in die Luftblase gebildet hat, und in dem die Mobilität der Ionen eingeschränkt war.

Da beim direkten Kontakt der Zelle mit der Elektroden spitze kein Unterschied der Impedanz festzustellen war, wurden mit den in Glaspipetten eingeschmolzenen Golddrahtelektroden keine weiteren Versuche unternommen. Es wurde davon ausgegangen, dass durch die größere Elektrodenoberfläche diese nicht vollständig von der Zellmembran abgedeckt wird und sich daher keine Änderungen in der Impedanz ergeben würden. Außerdem wiesen sie seltsamerweise einen noch höheren Gleichstromwiderstand auf als die Kohlefaserelektroden (250 M Ω , nicht aufgezeichnet).

4 Versuch des Auslösens einer Hyperpolarisation Activation (H. A.)

4.1 Vorbemerkungen

Millar und Armstrong-James ist es 1979 das erste Mal gelungen, mittels in Glas eingeschmolzener Kohlefasermikroelektroden Aktionspotentiale an verschiedenen Nervengewebe von Ratten und Katzen aufzunehmen, wobei an der Elektrodenspitze etwa 60 µm der Kohlefaser herausragten. Im darauffolgenden Jahr wurden mit diesen Elektroden Impedanzspektren aufgenommen, wobei die Länge der an der Elektrodenspitze blank liegenden Kohlefasern variiert wurden. Dabei zeigte sich, vereinfacht gesagt, dass die Impedanz der Elektrode zu höheren Frequenzen hin steigt, je weniger von der Kohlefaser an der Elektrodenspitze freiliegt (Fox et al., 1980). Sollte die Oberfläche der freiliegenden Kohlefaser wirklich durch feine Risse erhöht worden sein, dann sollte sich das bei Aufnahme eines aktiven elektrischen Signals der Zelle bei höheren Frequenzen positiv auswirken und bei niedrigen Frequenzen keinen Unterschied machen, vorausgesetzt, es kann bei Fibroblasten ein aktives elektrisches Signal ausgelöst werden. Tatsächlich wurde 1972 erstmals von Nelson et al. eine aktive elektrische Antwort auf einen negativen Strompuls in Form einer Hyperpolarisierung der Zellmembran von L-Zellen über die Dauer des Strompulses hinaus beobachtet. Diese Reaktion der Zelle wurde „hyperpolarisation activation“ oder kurz „H. A. Antwort“ genannt. Die Experimente wurden damals mit Intrazellulärelektroden gemacht. Es wurde ein Strompuls mit einer Amplitude von -15 nA und einer Dauer von 20 ms appliziert. Während der Dauer des Pulses erfolgte eine Hyperpolarisierung von -15 mV auf -200 mV. In der darauffolgenden Sekunde erfolgte eine Depolarisierung, gefolgt von der charakteristischen Hyperpolarisierung über die nächsten zwei bis drei Sekunden. Schließlich depolarisierte die Membran die letzten drei bis vier Sekunden. Die H. A. Antwort wird mit einem durch Calcium vermittelten Kaliumstrom aus der Zelle in Verbindung gebracht (Henkart und Nelson, 1979; Okada et al., 1979 und 1982).

1984 wurden weitere Experimente von Hosoi und Slayman an L-Fibroblasten aus einer Suspensionskultur durchgeführt, bei denen der Calcium-Einfluss auf die H. A. untersucht wurde. Dabei wurde die Whole-Cell-Clamp Methode verwendet. Über die Patch-Elektrode wurde ein negativer Strompuls mit einer Amplitude von -250 pA und einer Dauer von einer halben Sekunde appliziert. Die H. A. Antwort sah dergestalt aus, dass es zu einer schnellen Hyperpolarisierung kam und die Membran anschließend über eine Dauer von etwa einer Minute depolarisierte.

Die Überlegung war nun, mittels der Patchpipette im Current-Clamp Modus diese H. A. Antwort auszulösen und gleichzeitig die Transmembranspannung über die Patch-Elektrode und die Spannung an der Kohlefaserelektrode aufzunehmen, um den Spannungsverlauf an der Kohlefaserelektrode durch die Erstellung eines Ersatzschaltbildes erklären zu können, wie es schon Bove et al. (1995) mit der Aufnahme von Aktionspotentialen von Neuronen mit planaren Goldelektroden gemacht haben, wobei sie auf das Hodgkin-Huxley-Modell (1952) zurückgriffen und zusätzlich die Eigenschaften der Elektrode miteinbezogen.

4.2 Material und Methoden

Zuerst wurde nur geprüft, ob sich die H. A. Antwort reproduzieren lässt, ohne gleichzeitig eine Aufnahme mit der Kohlefaserelektrode vorzunehmen. Im Grunde genommen wurde sich dabei an das Protokoll von Hosoi und Slayman (1984) gehalten. Im HEKA Patchmaster Pulse Generator Fenster wurde ein Protokoll für den Current-Clamp Modus angefertigt, bei dem nach einer halben Sekunde ein halbsekündiger Strompuls mit einer Amplitude von -250 pA auftritt. Über die darauf folgenden 59 Sekunden wurde der Strom auf 0 A belassen. Bei den letzten drei Messungen wurde die Pulsdauer halbiert und die Stromstärke verdoppelt.

Die Zellen wurden zu den gleichen Bedingungen herangezogen, wie sie in 3.3.2.1. beschrieben sind. Die zum Patchen der Zellen verwendete Pipette wurde mit einem DMZ-Puller gezogen und danach poliert. Es wurde das Programm P10(B) (s. Anhang) verwendet, so dass die Pipette eine relativ stumpfe Endung (Abb. 21) und einen Widerstand von etwa 4 - 6 M Ω aufwies. Es wurden dickwandige Borsilikatglas-Pipetten (Modell GB 150-8P 0,86X1,50X80 mm, Science Products GmbH, Hofheim) verwendet.

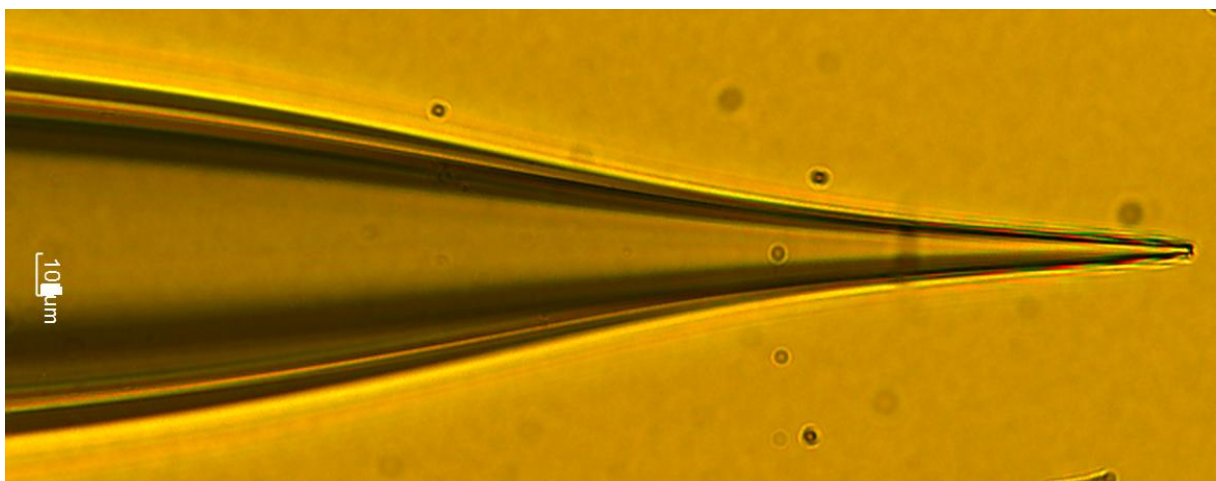


Abbildung 21 Spitze der Patchpipette für die Whole-Cell-Clamp Messungen

Die Pipette wurde mit einer Lösung befüllt, die 153 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 5 mM EDTA und 10 mM HEPES enthielt. Vor dem Eintauchen der Pipette wurde erst ein leichter Überdruck in dieser erzeugt. Darauf folgte eine Offset-Korrektur. Danach wurde die Pipettenspitze mit Hilfe des Mikromanipulators (BX51WI, Sutter Instrument, Navato CA) der Zelle angenähert, bis der gemessene Widerstand um 1 M Ω anstieg. Anschließend wurde der Überdruck wieder abgebaut und gewartet, bis sich ein Widerstand über 3 G Ω einstellte, wobei die Messung des Widerstands durch die Software sehr ungenau wurde, da die angezeigten Werte zwischen den genannten 3 G Ω und 50 G Ω hin und her sprangen. Während der Widerstand anstieg, was über eine Minute dauern konnte, wurde immer wieder ganz leichter Unterdruck auf die Pipette ausgeübt. Nachdem sich das Gigaseal eingestellt hatte, wurde die Pipettenkapazität kompensiert. Bereits schwacher Unterdruck auf die Pipette genügte, um die Zellmembran an der Pipettenspitze aufzubrechen, erkennbar dadurch, dass der gemessene Widerstand auf etwa 900 M Ω absank und die kapazitiven Ströme der Membran auf dem Oszilloskop erschienen. Die kapazitiven Ströme der Membran und der Zugangswiderstand wurden dann ebenfalls kompensiert. Schließlich wurde in den Current-Clamp Modus umgeschaltet und der Strom auf 0 A eingestellt, um das Ruhepotential zu messen.

4.3 Ergebnisse

Als Ruhepotentiale wurden sehr unterschiedliche Werte gemessen. Einmal betrug das Ruhepotential -38,9 mV (rot), bei der zweiten Messung (blau) -14 mV, was sich aber im Laufe der Zeit immer wieder verschob.

Während des Pulses hyperpolarisierte die Membran bei Zelle 1 auf -250 mV, bei Zelle 2 auf -180 und 140 mV bzw. auf zwischen -250 und -150 mV bei den letzten drei Messungen. Am Ende des Pulses depolarisierte die Membran wieder. Eine Hyperpolarisierungsantwort für die Dauer nach dem Puls konnte anders als bei Hosoi und Slayman (1985) nicht beobachtet werden (Abb. 22).

Für die beiden Zellen wurde von der Patchmaster Software bei der R_{Series} -Kompensation eine Membrankapazität von 25,03 und 21,15 pF und eine Membranleitfähigkeit von 2,38 und 2,01 nS errechnet.

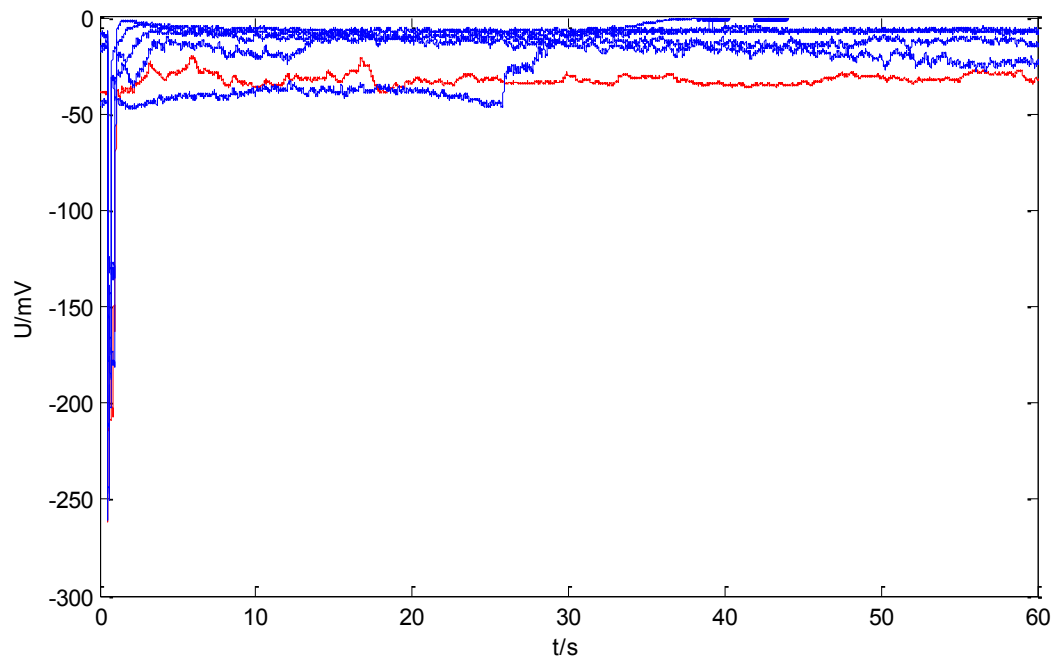


Abbildung 22 Aufzeichnung der Transmembranspannung von L929 Fibroblasten im Whole-Cell-Clamp Modus: Eine Hyperpolarisierung nach Gabe des Strompulses (1 s) konnte nicht beobachtet werden.

4.4 Diskussion

Eine Bestimmung der Ionenkonzentrationen im Zytosol von L-Fibroblasten wurden 1977 von Okada et al. und 1971 von Lamb und McKinnon durchgeführt, wobei Letztgenannte eine zusätzliche Messung der entsprechenden Permeabilitäten durchführten. Die Ergebnisse sind in Tab. 1 aufgelistet. Die Konzentrationen für das extrazelluläre Medium wurden der Arbeit von Nelson et al. von 1972 entnommen, die für ihre Experimente ebenfalls DMEM verwendeten.

Tabelle 1 Ionenkonzentrationen des Zytosols und des Nährmediums und Permeabilitäten der einzelnen Ionensorten

Ionensorte	Intrazelluläre Konzentration [mmol/l] (Lamb)	Intrazelluläre Konzentration [mmol/l] (Okada)	Extrazelluläre Konzentration [mmol/l]	Permeabilität [pm/s]
Kalium	171	151	5,4	0,42
Natrium	8,6	27,7	145	0,63
Chlorid	70	46,6	118	5,1

Diese Werte in Gleichung (16) eingesetzt, ergeben bei einer Temperatur von 310 K, also der Körpertemperatur, für die Werte von Lamb etwa -15 mV und die von Okada etwa -23 mV. Bei Zelle 1 wurde mit -38,9 mV eine weit negativere Transmembranspannung gemessen. Die beiden anderen Messungen kommen mit -14 und -8 mV eher in diesen Bereich. Es kann also davon ausgegangen werden, dass das Anpatchen der Membran erfolgreich war.

Dennoch konnte keine H. A. Antwort ausgelöst werden. Es wurden bei der zweiten Zelle (blau) noch drei weitere Pulse mit der doppelten Amplitude und der halben Pulsdauer appliziert. Dies hatte jedoch auch keinen Effekt. Eine weitere Zelle konnte noch angepatcht und über deren Membran zwei Pulse appliziert werden. Diese Messungen wurden jedoch in der obigen Abbildung nicht angezeigt, da diese Ergebnisse nicht brauchbar waren. Des Weiteren hat hier die automatische Kompensation des Eingangswiderstandes nicht funktioniert, was darauf hinwies, dass der Patch nicht geglückt war, obwohl im Current-Clamp Modus eine Spannung von etwa -15 mV gemessen werden konnte. Es hätte noch eine Änderung des Pulsprotokolls vorgenommen und die Pulsdauer entsprechend dem Protokoll von Nelson et al. (1972) auf 100 ms verkürzt und die Pulsamplitude variiert werden können. Da aber die Herstellung funktionierender Kohlefaser- und Goldmikroelektroden im Vordergrund stand, wurde aus Zeitgründen davon abgesehen.

Die errechneten Werte für die Membrankapazität und -leitfähigkeit können für den Vergleich mit anderen Messmethoden herangezogen werden. Nelson et al. bestimmten für den flächenbezogenen Membranwiderstand von L929 Zellen einen Wert von $20 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$, bei manchen Zellen wurden aber auch $80 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$ gemessen. Die mit Hilfe der Software ermittelte Membranleitfähigkeit lag zwischen 2,38 nS und 2,02 nS. Die reziproken Werte davon sind $420 \text{ M}\Omega$ und $496 \text{ M}\Omega$. Geteilt durch den flächenbezogenen Widerstand ergibt dies eine Zelloberfläche von etwa $4 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2$ und damit einen Zellradius von $17,5 \text{ }\mu\text{m}$. Der Zellradius eines L929 beträgt etwa 10 - 15 μm , insofern sind die gemessenen Werte realistisch.

Genauso kann man für die in der Impedanzspektroskopie viel wichtigere Membrankapazität vorgehen. Bei gemessenen Kapazitäten von 25,03 pF und 21,15 pF und einer oberflächenspezifischen Kapazität von $1 \text{ }\mu\text{F}/\text{cm}^2$ liegen die Oberflächen bei etwa $2 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2$. Die Zellradien würden sich dementsprechend auf 12,6 μm belaufen.

5 In PMMA eingebettete Elektroden

Um ausschließen zu können, dass der Goldbonddraht und die Kohlefaser nicht vollständig isoliert waren, und um möglicherweise den Eingangswiderstand der Elektrode zu verringern, wurden als nächstes Elektroden hergestellt, deren leitendes Material in PMMA eingebettet sein sollte. Das hatte zusätzlich den Vorteil, dass die Oberfläche einfacher geschliffen werden konnte.

5.1 Herstellung

In den Boden einer Petrischale (Falcon,TM Corning Inc, Corning, USA) wurde mit einem MICROMOT Handbohrgerät (Proxxon GmbH, Föhren), ein Loch mit einem Durchmesser von 300 µm gebohrt. Durch dieses Loch wurde die Kohlefaser bzw. der Goldbonddraht geführt, bis er etwa einen Zentimeter in das Innere der Schale hineinragte. Auf die andere Seite der Petrischale wurde ein Kupferdraht gelegt und so positioniert, dass sich das eine Ende des Drahtes ganz in der Nähe des Bohrlochs befand und das andere Ende etwas über den Rand der Schale hinausragte. Der Kupferdraht wurde mit ein wenig Heißkleber fixiert. An das Ende, das über den Rand der Petrischale hinausragte, wurde schließlich ein gewinkelter Stift angelötet. An dieser Stelle wurde noch ein Schrumpfschlauch übergestülpt und erhitzt.

Unter dem Abzug wurde Dibenzoylperoxyd (Palapress, Hareus Kulzer GmbH, Hanau) in einem Kronkorken vorgelegt, dazu Methacrylsäuremethylester (Palapress, Hareus Kulzer GmbH, Hanau) gegeben und das Ganze mit einem kleinen Stäbchen vermischt. Dieses sich in Reaktion befindliche Gemisch wurde in den Bereich um die in die Petrischale hineinragende Faser bzw. den Draht getropft und diese dann in einen Drucktopf gelegt. Dieser wurde bis zum Rand mit heißem Wasser befüllt. Der Topf konnte, nachdem er abgedeckt wurde, in einen Schraubstock eingespannt werden. Der Schraubstock wurde soweit zugedreht, dass der Druck auf die Kanne 2 bar betrug. Die Kanne wurde dann eineinhalb Stunden stehen gelassen, bis das Reaktionsgemisch auspolymerisiert war, und die Elektroden danach wieder herausgeholt (Abb. 23). Nachdem die Petrischale mit Wasser befüllt war, wurde die Oberfläche der Elektrode schließlich in mehreren Stufen mit Schmiergelpapier geschliffen und schließlich mit Diamantpapier (Ocean Optics Inc., Dunedin) poliert (Abb. 24).

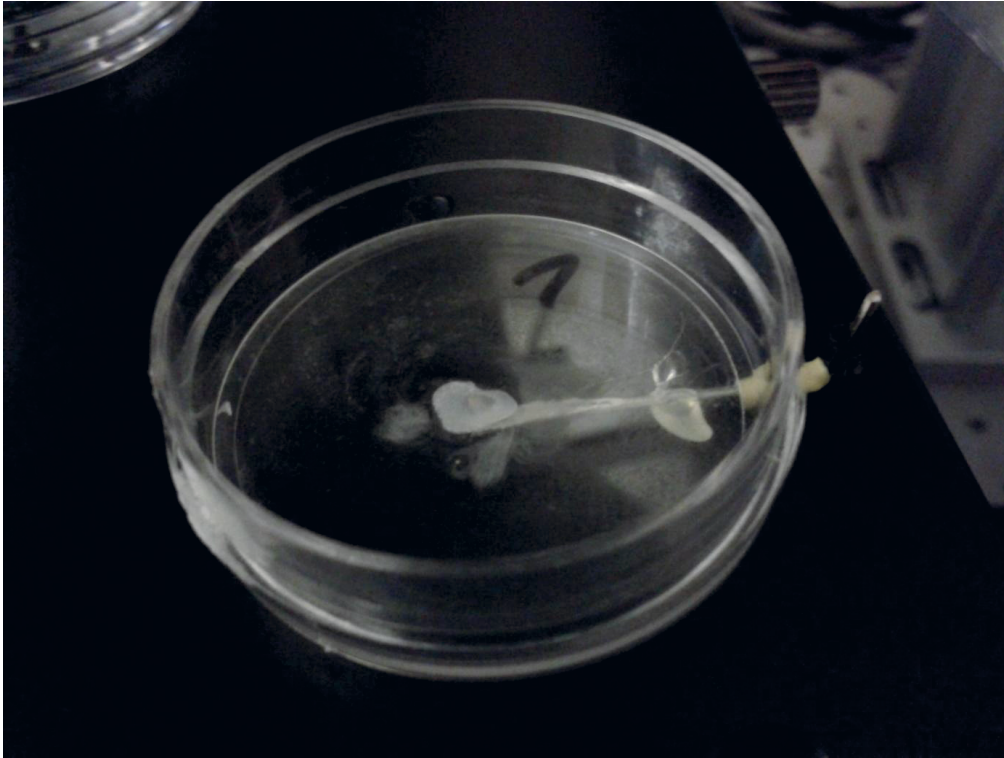


Abbildung 23 In PMMA eingebettete Kohlefaserelektrode

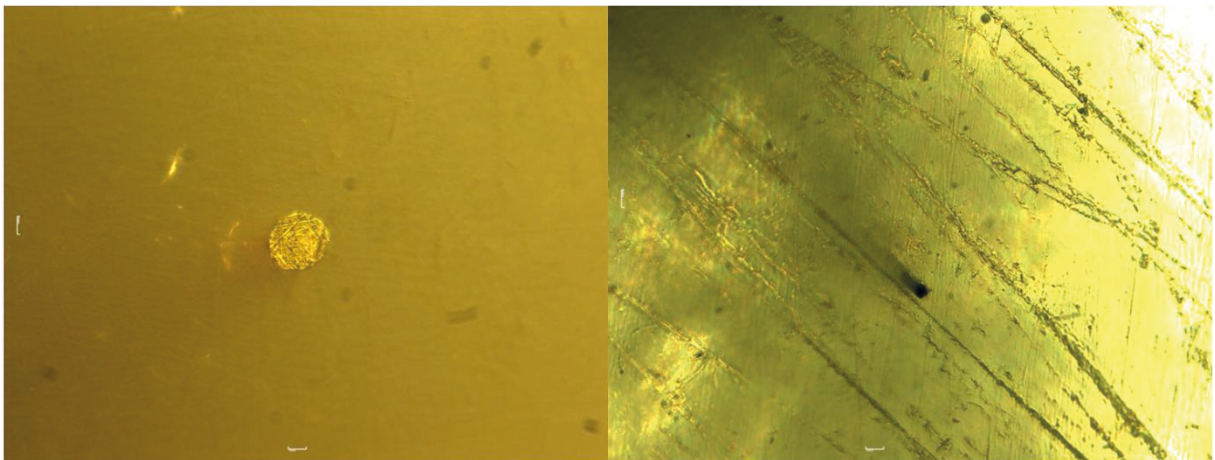


Abbildung 24 Aufsicht auf die in PMMA eingebettete Gold- (links) und Kohlefaserelektrode (rechts). Die Länge der weißen Balken entspricht 10 μm .

5.2 Erste Spektren

Die Impedanz fiel in der doppelt-logarithmischen Auftragung von etwa $600\text{ M}\Omega$ bei 10 Hz auf etwa $1\text{ M}\Omega$ bei 15 kHz (Abb. 25).

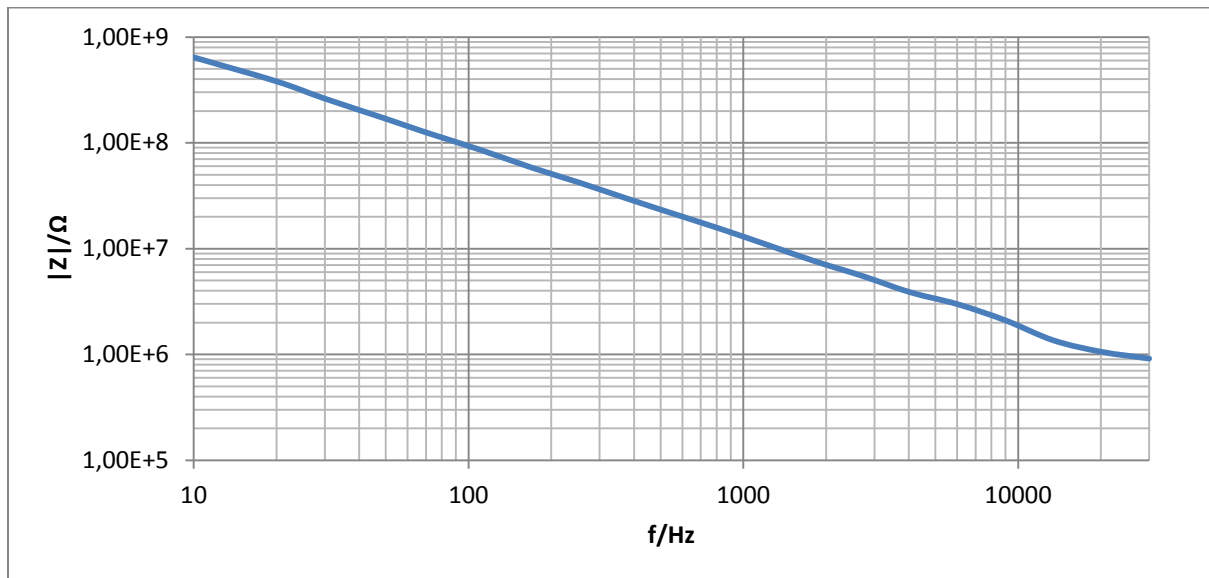


Abbildung 25 Impedanzspektrum einer in PMMA eingebetteten Kohlefaserelektrode, die an den EPC 10 Verstärker angeschlossen wurde.

In dem von der HEKA Patch-Clamp Anlage durch die zwei Besselfilter vorgegebenen Frequenzbereich liegt entgegen der Erwartung die Impedanz der in Plexiglas eingebetteten Kohlefaser mit Kontakt zu PBS also um eine Zehnerpotenz höher. Es war daher vonnöten in einem höheren Frequenzbereich zu messen, um bei niedriger Impedanz der Elektrode die Impedanz der Zelle erfassen zu können. Dazu musste aber ein anderes Frontend zwischen Elektrode und dem Handyscope angeschlossen werden.

5.3 Endgültiger Versuchsaufbau

5.3.1 Vorbereitung der Zellen

Die Zellen wurden, nachdem das Medium (s. 3.3.2.1) abgesaugt worden war, mit 5 ml PBS ohne Ca^{2+} gewaschen, anschließend mit 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung beträufelt und für zwei bis drei Minuten in den Inkubator gestellt. Danach wurden sie mit 4 ml zusätzlichem Nährmedium abgesaugt und in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen (Falcon,TM Corning Inc, Corning, USA) überführt. Dieses wurde dann für 5 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen mit 5 ml Kulturmedium wieder resuspendiert. Der Teil der Zellen, der nicht für die weitere Kultur benötigt wurde, wurde für die Experimente verwendet.

5.3.2 Verwendete Mikropipetten

Eine Borsilikatglaskapillare wurde mit dem Programm P(B) 14 (s. Anhang) auseinandergezogen, so dass lang auslaufende Spitzen entstanden, die einen Durchmesser von etwa 4 μm aufwiesen (Abb. 26). Diese wurden mit etwas PBS gefüllt.

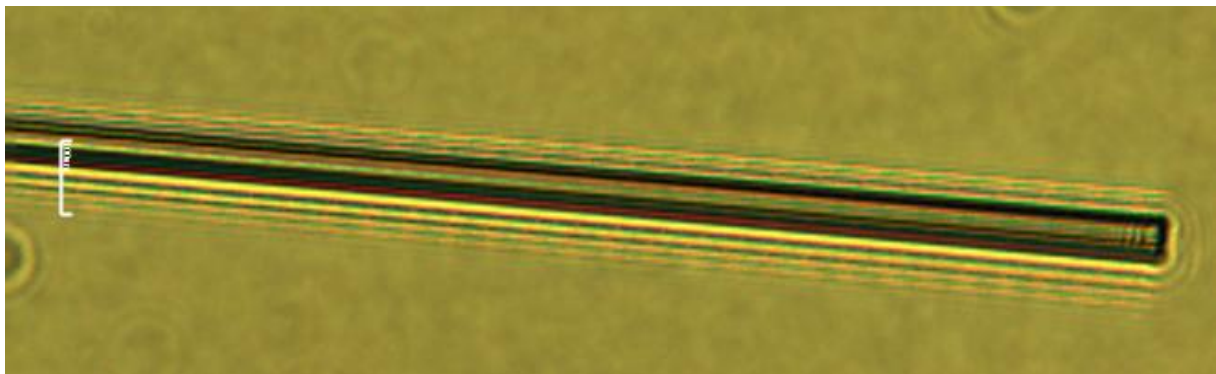


Abbildung 26 Spitze der Pipette, die zur Positionierung der Zelle auf die Mikroelektrode verwendet wurde. Die Länge des weißen Balkens entspricht 10 μm .

5.3.3 Durchführung

Die Pipette wurde an den Pipettenhalter der HEKA Patch-Clamp Anlage angebracht. Über die Öffnung des Pipettenhalters wurde ein Silikonschlauch gezogen, über den ein Unterdruck auf die Pipette ausgeübt werden konnte. Von der Zellsuspension wurden 2 mL bis 3 mL in die Petrischale mit integrierter Elektrode gegeben. Damit sich die Zellen etwas erholen konnten, wurde die Suspension für etwa eine halbe Stunde auf dem beheizbaren Objektisch des

Mikroskops stehen gelassen. Die Temperatur wurde auf 39 °C eingestellt. Die Pipettenspitze wurde dann mit Hilfe des Mikromanipulators in die Nähe einer Zelle gebracht. Dort wurde über den Silikonschlauch ein Unterdruck auf die Pipette ausgeübt und so die Zelle angesaugt.

Die Messung selbst erfolgte, wie schon in Punkt 3.1.1. beschrieben, nur mit dem Unterschied, dass das Handyscope nicht über den EPC 10 Verstärker mit dem Elektrodensystem verbunden war, sondern über ein eigens entwickeltes Frontend (Abb. 27), um das Signal zu verstärken. Über einen Rückkopplungswiderstand, der in diesem Fall 100 k Ω betrug, wurde aus dem vom AWG Ausgang des Handyscopes ausgehenden Spannungssignal ein Stromsignal mit einer Amplitude von 100 nA geformt. Außerdem deckte nun das Multisinussignal einen Frequenzbereich zwischen 10 kHz und 10 MHz ab.



Abbildung 27 Versuchsaufbau zur Impedanzspektroskopie: Rechts unter dem Monitor ist das TiePie Handyscope, das als Spannungsquelle diente, zusammen mit dem Netzteil zu sehen, welches das damit verbundene Frontend mit Spannung versorgte. Das Frontend diente dann als spannungsgesteuerte Stromquelle. An das Frontend wurde schließlich die Mikroelektrode angeschlossen (hier im Bild nicht zu sehen).

Zuerst wurde ein Spektrum mit der blanken Elektrode aufgenommen. Die Zelle wurde dann über der Elektrode positioniert und auf die Elektrode abgesetzt (Abb. 28). Danach wurde ein weiteres Spektrum aufgenommen.

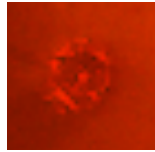


Abbildung 28 Aufsicht auf eine Goldelektrode, die mit einer Zelle besetzt ist (Durchmesser der Elektrode: 35 μm)

5.4 Ergebnisse und Diskussionen

5.4.1 Kohlefasern

5.4.1.1 Ergebnisse

Die Impedanz einer blanken Elektrode fällt in der doppelt logarithmischen Auftragung von etwa 1,5 M Ω bei 10 kHz auf etwa 5 k Ω bei 10 MHz (blau). Dies war auch der Fall, wenn eine Zelle auf die Elektrode gesetzt wurde (lila). In einem einzigen Fall, in dem eine Zelle auf die Elektrode gesetzt wurde, war ein deutlicher Anstieg der Impedanz über das gesamte Spektrum festzustellen (rot). Hier fiel die Impedanz von 6 M Ω bei 10 kHz linear auf etwa 15 k Ω bei 10 MHz (Abb. 29).

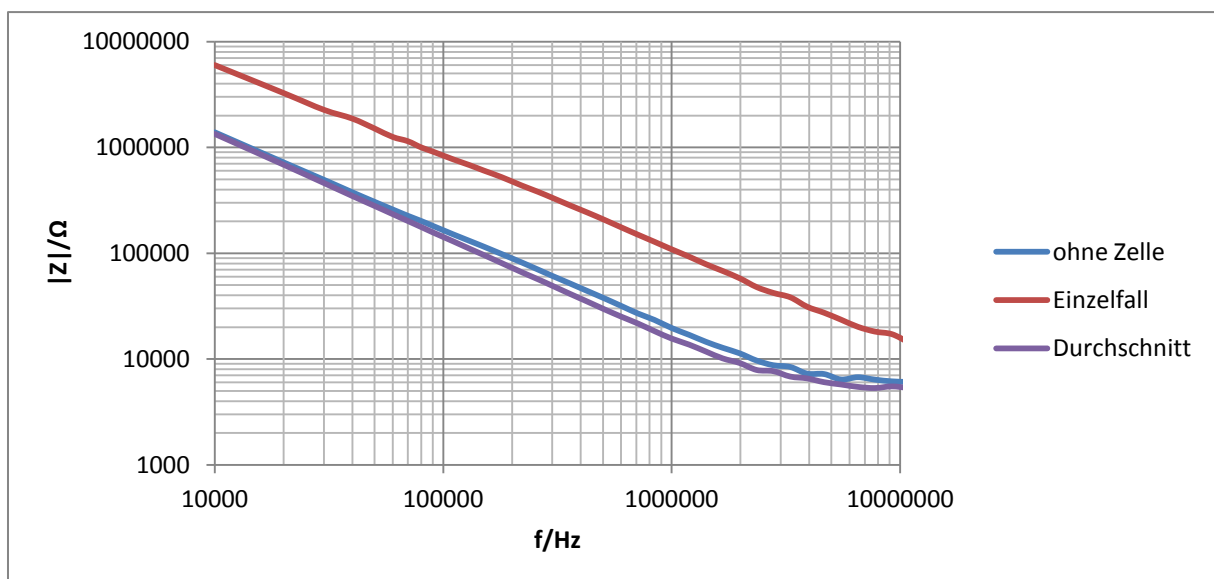


Abbildung 29 Impedanzspektren der in PMMA eingefassten Kohlefaserelektrode: Es konnte kein Unterschied zwischen einer blanken (blau) und einem mit einer Zelle besetzten Elektrode (lila) gemessen werden.

5.4.1.2 Diskussion

Der Grund, weshalb sich im Vergleich der Messungen mit und ohne einer auf der Elektrodenoberfläche platzierten Zelle kein Unterschied zeigte, liegt wohl daran, dass das Material der Kohlefaser wesentlich härter ist als das Plexiglas. Dadurch wurde beim Schleifen im Verhältnis weniger Material abgetragen, so dass ein Teil der Kohlefaser herausragte. Diese Annahme wurde durch eine Aufnahme der Elektrodenoberfläche mit einem Rasterkraftmikroskop bestätigt (Abb. 30). Bei der Profilaufnahme kann man erkennen, dass die Kohlefaser fast einen ganzen Mikrometer aus der Ebene herausragt. Wird die Zelle auf die Spitze der Faser abgesetzt, so fließt der Strom zur Elektrode ausschließlich über die Flanken.

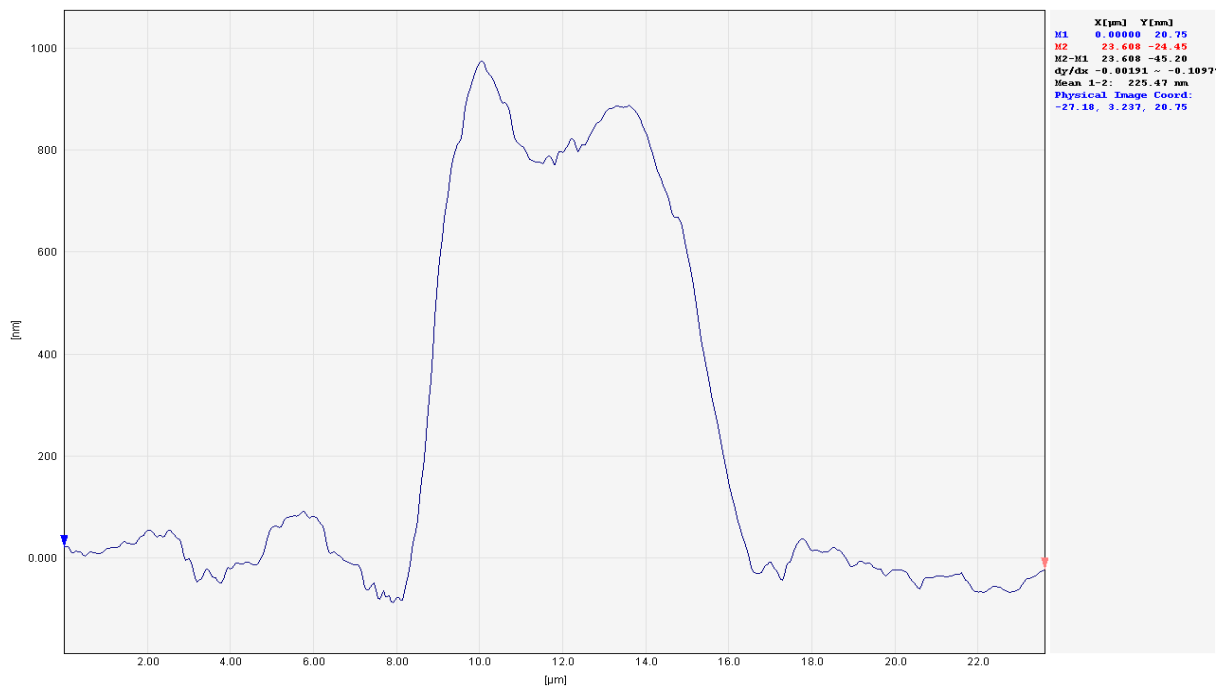


Abbildung 30 Profilbild der in PMMA eingefassten Kohlefaserelektrode mittels AFM

Mit Hilfe dieser Aufnahme ist es möglich, die Doppelschicht-Kapazität der Kohlefaserelektrode abzuschätzen und damit das Impedanzspektrum besser verstehen zu können. Man kann die Oberfläche dieser Elektrode annähernd als Zylinder mit einer Höhe von 800 nm und einem Radius von 3,5 µm betrachten. Die Oberfläche, die in die Messkammer hineinragt, beträgt dann etwa 56 µm². Die Doppelschichtkapazität würde dann bei einer oberflächenspezifischen Kapazität von 0,2 F/m² (Fox et al., 1980) 11,2 pF betragen. Das bedeutet, bei einer Frequenz von 20 kHz betrüge der Blindwiderstand 710,5 kΩ. Tatsächlich liegt die Impedanz der Messung bei dieser Frequenz zwischen 400 und 500 kΩ. Die tatsächliche Kapazität der Elektrode liegt also

zwischen 15 und 20 pF, was wohl in Oberflächenunebenheiten begründet liegt. Dass der Streuwiderstand, der bei Elektroden in dieser Größenordnung im Bereich zwischen 15 und 30 k Ω liegen sollte, aus dem Impedanzspektrum nicht herauszulesen ist, ist merkwürdig, da er sich als Stufe auf dem eben genannten Niveau bemerkbar machen sollte.

Die einzelne Messung (rot) (Abb. 29), bei der sich eine Vergrößerung der gemessenen Impedanz beobachten ließ, könnte vielleicht durch eine Verunreinigung an der Pipettenöffnung erklärt werden, die einen Teil der Elektrodenoberfläche bedeckte.

5.4.2 Goldbonddraht

5.4.2.1 Ergebnisse

In Abb. 31 sind jeweils der Absolutbetrag der Impedanz der blanken Elektrode und der mit einer Zelle belegten Elektrode abgebildet. Der Betrag der Impedanz sinkt in der doppelt logarithmischen Auftragung im Frequenzbereich von 1 kHz bis 100 kHz linear von etwa 500 k Ω bzw. 800 k Ω auf etwa 20 k Ω . Danach flacht die Steigung bis 600 kHz etwas ab und geht anschließend wieder in einen linearen Bereich über. Ab einer Frequenz von 3 M Ω bleibt der Betrag der Impedanz auf einem Wert von etwa 5 k Ω stabil.

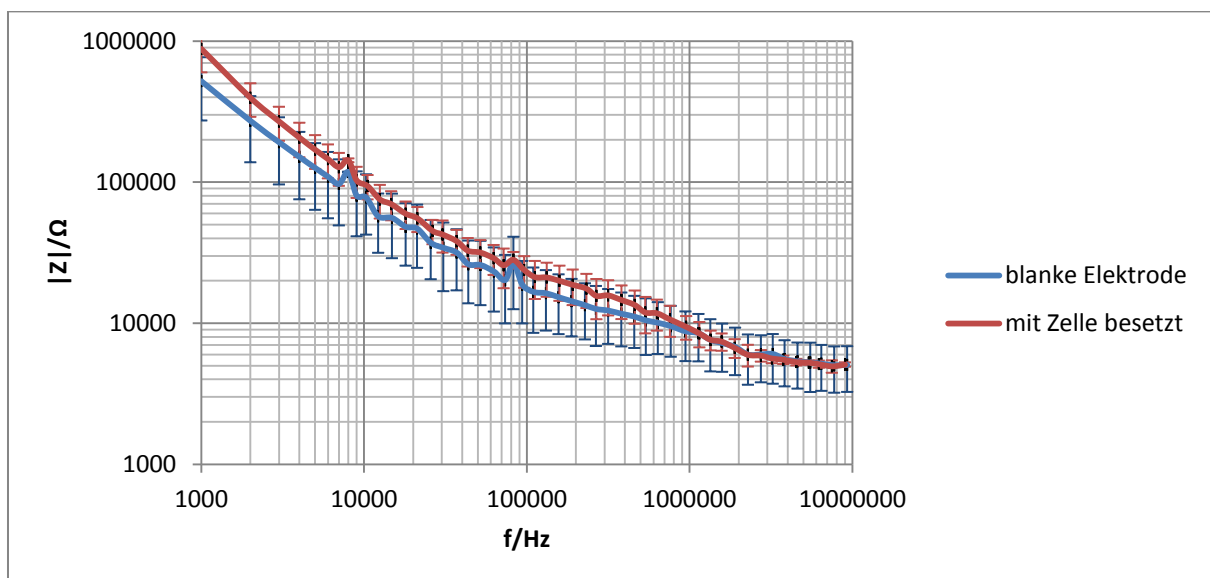


Abbildung 31 Impedanzspektren der in PMMA eingefassten Goldmikroelektrode

Der Phasenwinkel der Impedanz (Abb. 32) steigt zuerst ausgehend von etwa -85° bei 1 kHz auf etwa -35° bei 200 kHz an. Danach bleibt der Phasenwinkel bei der mit einer Zelle besetzten Elektrode bis 1 MHz in etwa konstant bei 35° , während der Phasenwinkel bei der blanken Elektrode weiterhin kleiner wird, wobei die Steigung jedoch etwas abflacht. Bei einer Frequenz von etwa 2 MHz treffen sich die beiden Graphen wieder und weisen im Weiteren keine signifikanten Unterschiede auf.

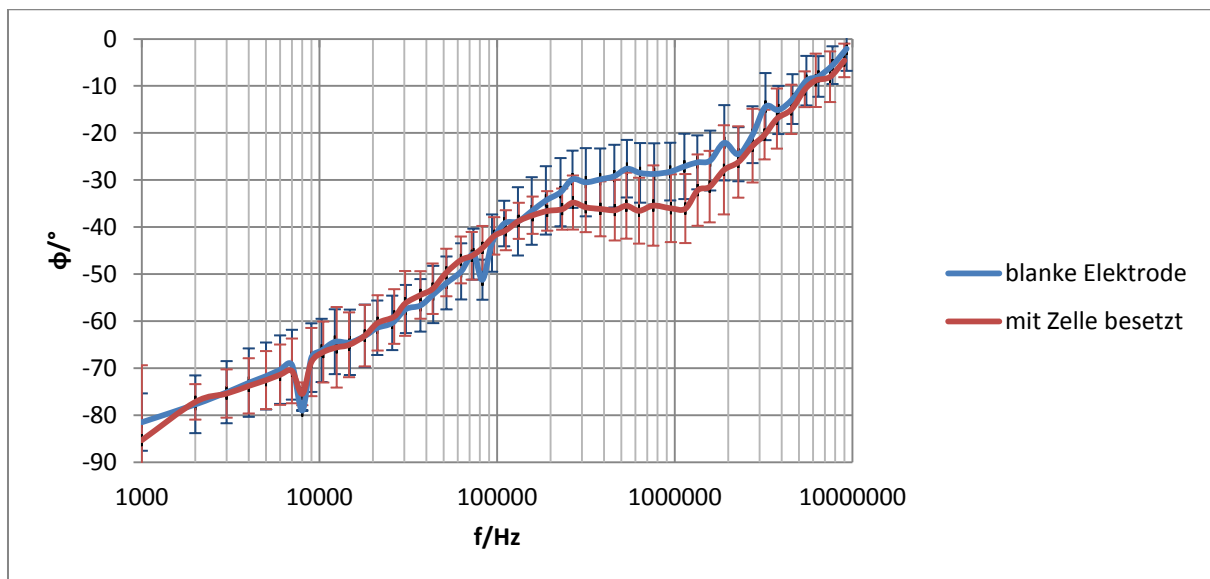


Abbildung 32 Phasenwinkel der in PMMA eingefassten Goldmikroelektrode

5.4.2.2 Diskussion

Zunächst sei an dieser Stelle angemerkt, dass sich die einzelnen Messungen voneinander sehr stark unterscheiden, weswegen die Streuung der Messwerte so stark ausfiel (Abb. 30, 31). Dies war auch der Fall, wenn die Elektrode nicht mit einer Zelle besetzt war. In diesem Fall sollte es weder Unterschiede in der Doppelschicht-Kapazität noch im Streuwiderstand geben, da die elektrische Leitfähigkeit bzw. die Ionenzusammensetzung des Mediums gleich geblieben sein sollte. Unterschiede könnten durch von Zellen abgeschiedenen Metaboliten verursacht worden sein. Da aber der Medienwechsel meist nur eine Stunde vor Beginn der Messungen stattgefunden hat, sollte die Stoffwechselaktivität der Zellen eigentlich keinen Einfluss haben.

Im Vergleich der Messungen mit der blanken und der mit einer Zelle besetzten Elektrode fallen keinerlei Unterschiede auf. Lediglich bei den Phasenwinkeln ergab sich eine Verschiebung um etwa 5° zwischen 200 kHz und 1 MHz. Diese war jedoch nicht statistisch signifikant (Abb. 32). Dass im Verlauf des blauen Graphen eine Stufe auftritt, deutet auf eine parasitäre Kapazität neben der Doppelschicht-Kapazität hin, die nicht von der Zelle stammt.

Prinzipiell wäre eine Erhöhung der Gesamtimpedanz im mittleren bis hohen Frequenzbereich durch den Sealwiderstand zu erwarten gewesen, der dadurch auftritt, dass die Zelle zumindest einen Teil der Elektrode verdeckt und dadurch den Strom der Ionen an der Elektrodenoberfläche einschränkt. Möglicherweise wurden die Zellen nicht nahe genug an die Elektrode herangebracht. Tatsächlich waren die Sichtverhältnisse unter dem Mikroskop durch die Dicke des PMMA und die geringe Transmission des Mediums sehr ungünstig. Es wurde jedoch beim Heranfahren der Zelle immer darauf geachtet, dass die Elektrodenoberfläche zunächst im Fokus stand und daraufhin die Zelle in den Fokus gebracht wurde.

Eine weitere Erklärung dafür, weshalb sich bei den Messungen zwischen blanker Elektrode und mit Zelle besetzter Elektrode keine Unterschiede ergaben, könnte darin begründet sein, dass die Zellmembranen durch die Behandlung mit Trypsin sehr empfindlich und fragil gemacht wurden. Unter der Annahme, dass Membranproteine oder Proteine, die für die Zelladhäsion an die Elektrodenoberfläche verantwortlich sind, einen Beitrag zur Membrankapazität leisten, würde die Behandlung der Zellen mit Trypsin (ein Verdauungsenzym, welches Peptidverbindungen spaltet) ebenfalls dafür sorgen, dass im Impedanzspektrum der Anteil der Membrankapazität an der Gesamtimpedanz nicht sichtbar wird.

5.5 Verdünnungsreihe mit Goldelektrode

Da beim gemessenen Spektrum der blanken Elektrode in Kontakt mit DMEM bereits eine leichte Stufe, die auf eine von der Zelle unabhängige Kapazität hindeutet, erkennbar war (Abb. 30) und DMEM ein komplexes Medium darstellt, in dem sich neben Salzen auch noch Zucker und Aminosäuren befinden, wurde mit derselben Elektrode eine Verdünnungsreihe mit PBS gemessen, um eventuell die einzelnen Elemente, die für die Gesamtimpedanz des Systems verantwortlich sind, genauer analysieren zu können. Mit Hilfe eines mit MATLAB (The MathWorks Inc., Natick) geschriebenen Simulationsprogramms konnten diese einzelnen Elemente genauer quantifiziert und entsprechend ihrer Größe eventuell einzelnen physikalischen Entitäten zugeordnet werden.

5.5.1 Durchführung

Acht Zentrifugenröhrchen (10 mL) wurden bereitgestellt und sieben davon mit 5 mL destilliertem Wasser befüllt. Das achte Röhrchen enthielt 140 mM PBS. Von der PBS wurden 5 mL in das nächste Röhrchen pipettiert. Nach Umrühren wurden von dieser verdünnten PBS (70 mM) 5 mL in das nächste Röhrchen pipettiert, bis das letzte Röhrchen 10 mL einer 1,09 mM PBS enthielt. Von jeder verdünnten Lösung wurde wie in Punkt 5.3.3. beschrieben ein Impedanzspektrum aufgenommen. Zur Auswertung wurde ein Ersatzschaltbild entwickelt, was die reale Messung möglichst gut wiedergeben sollte.

5.5.2 Ergebnisse

Die Messung der Leitfähigkeit ergab folgendes:

Tabelle 2 Mit dem Leitfähigkeitsmessgerät gemessene Leitfähigkeiten für die verschiedenen PBS-Verdünnungen

c(NaCl)/mM	κ /S/m
1,09	1,43E-02
2,19	2,80E-02
4,38	5,60E-02
8,75	1,10E-01
17,5	2,14E-01
35	4,06E-01
70	7,55E-01
140	1,29E+00

In der doppelt-logarithmischen Auftragung des Betrags der Impedanz gegen die Frequenz (Abb. 33) sind qualitativ zwei Stufen zu erkennen. Eine befindet sich zwischen 10 MHz und 1 MHz, die andere verschiebt sich mit zunehmender Verdünnung von einem Bereich bei 100 kHz bei 140 mM zu einem Bereich bei 1 kHz bei einer Konzentration von 1 mM. Das Niveau dieser Stufe steigt mit zunehmender Verdünnung von 30 k Ω auf 2 M Ω . Bei niedrigen Verdünnungen wird bei niedrigen Frequenzen eine zweite Steigung sichtbar.

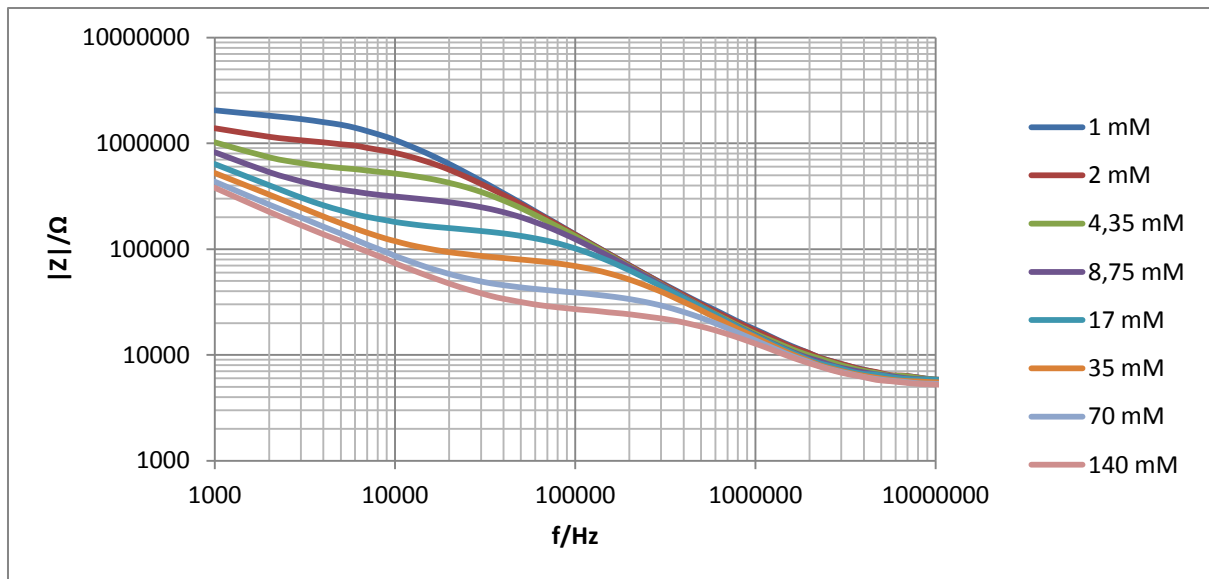


Abbildung 33 Impedanzspektren der verschiedenen PBS-Verdünnungen, gemessen mit der Goldmikroelektrode

Bei der Auftragung der Phasenwinkel gegen die Frequenz (Abb. 34) ist ein lokales Minimum erkennbar, welches bei einer Konzentration von 140 mM bei 1 MHz auftritt und mit zunehmender Verdünnung zu niedrigeren Frequenzen hin verschoben ist und dabei immer größer wird. Bei schwachen Verdünnungen bis 35 mM wird bei 1 kHz noch ein globales Minimum erkennbar. Zu hohen Frequenzen hin nähert sich der Phasenwinkel der 0.

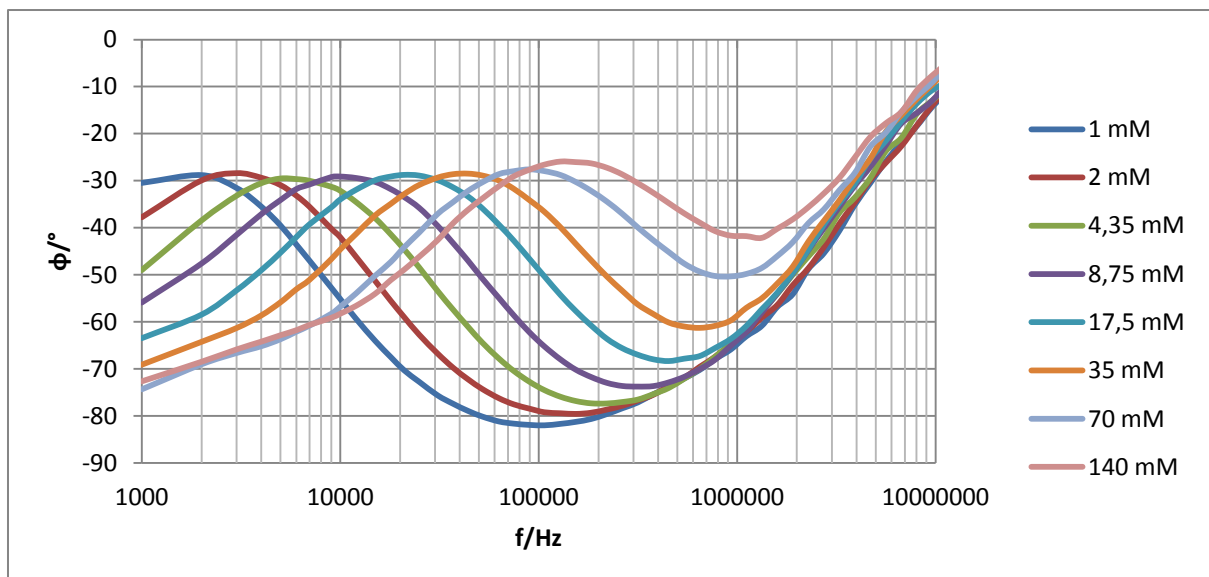


Abbildung 34 Verlauf der Phasenwinkel der verschiedenen PBS-Verdünnungen, gemessen mit der Goldmikroelektrode

Die Ortskurven (Abb. 35) zeigen mit zunehmender Verdünnung einen im Umfang und Radius immer kleiner werdenden Halbkreis, dessen Verlauf nicht an der Abszisse abschließt, sondern nach Durchlaufen des Minimums in eine steile Gerade mit negativer Steigung übergeht. Bei höheren Konzentrationen ist jedoch vor dem Übergang in die Gerade eine leichte Biegung festzustellen.

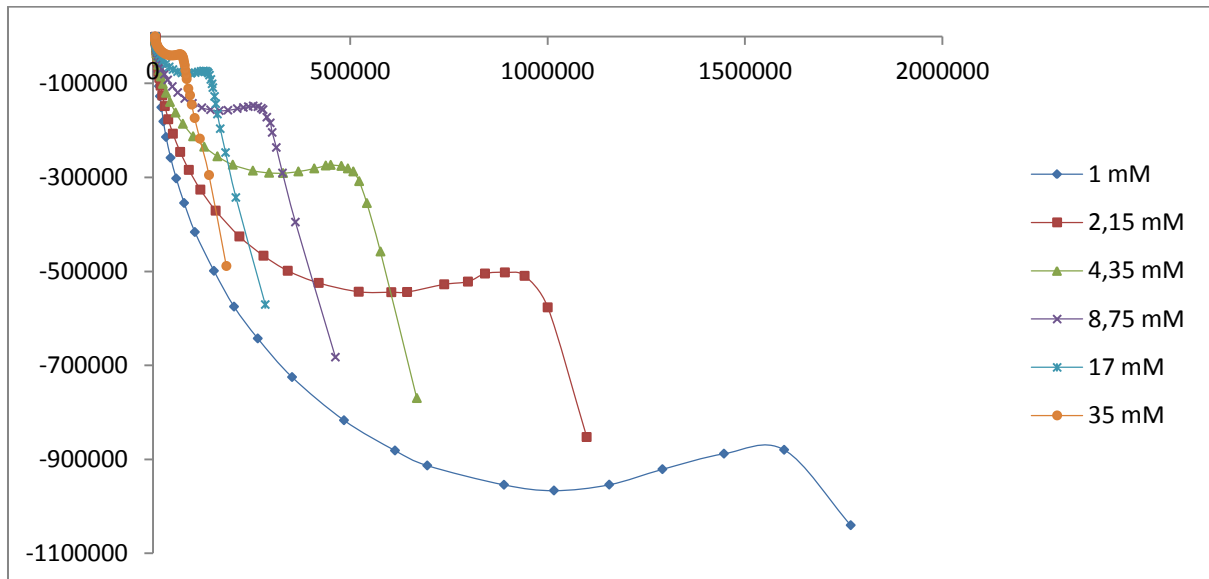


Abbildung 35 Ortskurven der Impedanzmessungen der verschiedenen PBS-Verdünnungen

5.5.3 Auswertung

Um die gemessenen Daten interpretieren zu können, wurde in MATLAB (The MathWorks Inc., Natick) eine Ersatzschaltung simuliert, die diese möglichst getreu wiedergeben sollte. Diese besteht aus einer Kapazität C_1 . In Reihe dazu liegen eine Kapazität C_2 und ein Widerstand R_2 , die zueinander parallel geschaltet sind. In Serie zu diesen Elementen ist noch ein Widerstand R_3 geschaltet (Abb. 36).

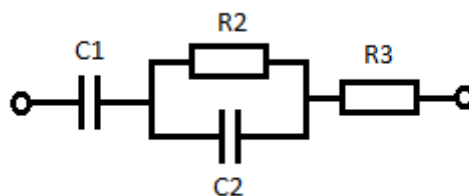


Abbildung 36 Ersatzschaltung, die das untersuchte Elektrodensystem repräsentiert

Die Gesamtimpedanz des Systems ergibt sich also aus folgender Formel:

$$Z_{ges} = \frac{1}{(j2\pi f)^n C_1} + \frac{R_2}{1 + j2\pi f C_2 R_2} + R_3$$

Um die gemessenen Kurven anpassen zu können, wurden für die verschiedenen Konzentrationen die in Tabelle 3 aufgeführten Werte eingesetzt.

Tabelle 3 Die durch die Simulation ermittelten Werte der Elemente des Ersatzschaltbildes zur Anpassung an die gemessenen Daten

[NaCl]/mM	C ₁	n	C ₂	R ₂	R ₃
140	0,9 nF	0,88	16,95 pF	17,22 kΩ	5,05 kΩ
70	0,82 nF	0,88	15,58 pF	29,6 kΩ	5,05 kΩ
35	867,22 pF	0,87	14,25 pF	66,02 kΩ	5,15 kΩ
17,5	817,85 pF	0,86	13,55 pF	128,5 kΩ	5,6 kΩ
8,75	825 pF	0,85	13,8 pF	249,52 kΩ	5,8 kΩ
4,35	836,86 pF	0,84	13,6 pF	470,3 kΩ	5,8 kΩ
2,15	893,79 pF	0,83	13,44 pF	893,79 kΩ	6 kΩ
1	757,98 pF	0,84	13,39 pF	1,57 MΩ	6 kΩ

Die simulierten Graphen sind in Abb. 37 zusammen mit den gemessenen Daten abgebildet. Man kann erkennen, dass die Simulation recht nahe an die Realität heran kommt. Bis zur Verdünnung von 17,5 mM konnten bei niedrigen Frequenzen keine genauen Anpassungen mehr vorgenommen werden, da hier der Betrag der Impedanz im Vergleich zur Simulation zu niedrigen Frequenzen hin stärker anstieg. Dies hing im Besonderen mit einem steiler ansteigenden Realteil zusammen (Daten nicht gezeigt).

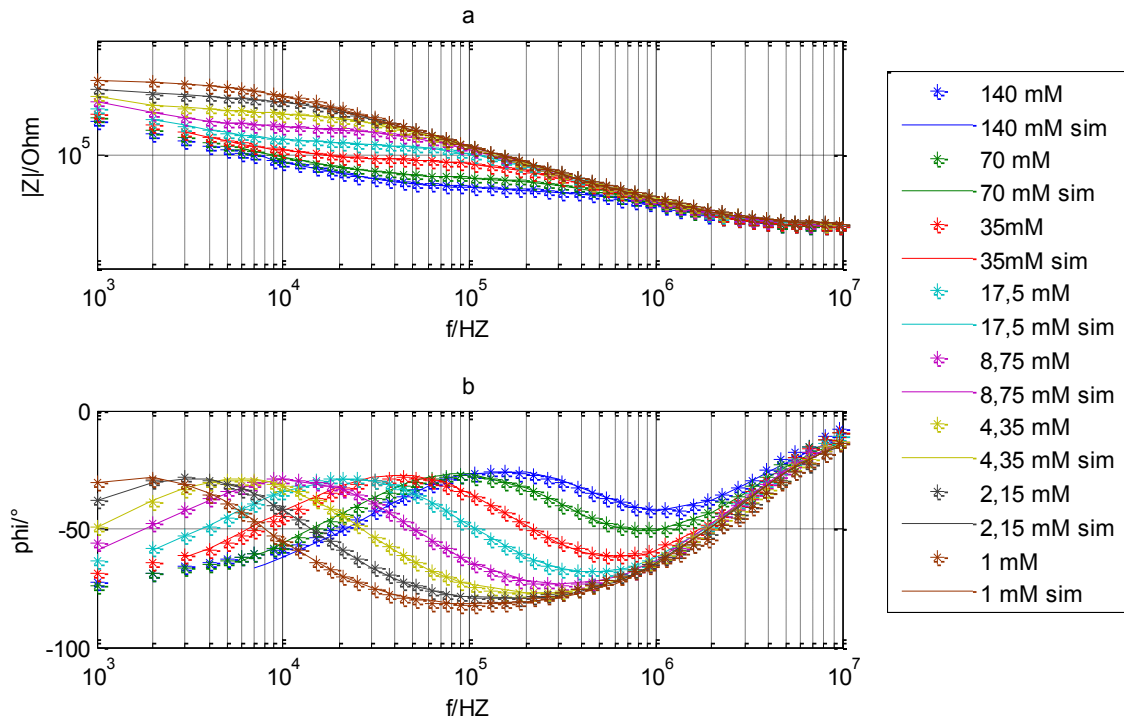


Abbildung 37 Die Bode-Diagramme der gemessenen und simulierten Daten

Zunächst tritt bei niedrigeren Frequenzen eine dominante Kapazität auf, die im Ersatzschaltbild mit C_1 gekennzeichnet ist (Abb. 36). Dabei handelt es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um die Doppelschichtkapazität der Elektrode. Die oberflächenbezogene Kapazität für Metallelektroden liegt zwischen $0,1$ und $0,5 \text{ F/m}^2$ (Abdur Rahman et al., 2007). Die Elektrodenoberfläche beträgt grob geschätzt $962 \mu\text{m}^2$. Bei der größten anzunehmenden flächenspezifischen Kapazität von $0,5 \text{ F/m}^2$ ergibt sich ein Wert von 480 pF . Die aus der Simulation berechneten Kapazitäten belaufen sich mit Werten zwischen 900 und $757,98 \text{ pF}$ auf fast das Doppelte. In Abb. 21 ist jedoch zu erkennen, dass die Elektrodenoberfläche nicht ganz plan geschliffen werden konnte und die Oberfläche damit sicherlich deutlich größer ist als die geschätzten $962 \mu\text{m}^2$. Um Oberflächenunebenheiten mit zu berücksichtigen wurde der Exponent n eingeführt, mit dem der Wert von Z_{C1} angepasst wurde. Dessen Werte beliefen sich zwischen $0,88$ und $0,84$.

Die Werte für R_2 reichen von $17,22 \text{ k}\Omega$ bei einer Konzentration von 140 mM NaCl bis $1,57 \text{ M}\Omega$ bei einer Konzentration von 1 mM , wobei sich die Werte mit halbierender Konzentration annähernd verdoppeln. Das lässt auf einen Zusammenhang mit der Elektrolytleitfähigkeit bzw. dem -widerstand schließen, die sich bei Mikroelektroden durch den Ausbreitungswiderstand bemerkbar machen. Die theoretisch hergeleiteten Werte für den Streuwiderstand aus der Formel (16) und den Werten aus Tabelle 2 sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 4 Errechnete Streuwiderstände nach Formel (16)

$c(\text{NaCl})/\text{mM}$	R_s
140	7 k Ω
70	12 k Ω
35	22,4 k Ω
17,5	42,6 k Ω
8,75	82,5 k Ω
4,35	162 k Ω
2,15	325 k Ω
1	636 k Ω

Beim Vergleich mit den in Tabelle 4 aufgelisteten Werten fällt auf, dass die gemessenen Werte fast doppelt so hoch sind. Dieser Sachverhalt ist auch schon in anderen Veröffentlichungen aufgetreten (Fox et al., 1980; Pliquet et al., 2010). Dies hängt möglicherweise mit einer stärker eingeschränkten Beweglichkeit der Ionen in der Nähe der Elektrode zusammen.

Bei der Interpretation des Wertes für C_2 treten erhebliche Schwierigkeiten auf. Es stellt sich die Frage, worin diese Kapazität physikalisch begründet liegt. Es treten bei solchen Elektroden immer auch parasitäre Kapazitäten auf, die durch die elektrischen Zuleitungen verursacht werden. In diesem Fall müsste die Kapazität parallel zur Doppelschichtkapazität und zum Streuwiderstand geschaltet sein. Da die Doppelschichtkapazität schon bei relativ niedrigen Frequenzen kurzgeschlossen wird, würde sich ein ähnliches Impedanzspektrum ergeben. Durch den Aufbau der Elektrode lassen sich die parasitären Kapazitäten in diesem Fall recht schlecht abschätzen. Ein erheblicher Anteil wird jedoch vermutlich vom Silberleitlack ausgehen, der an der Petrischalenunterseite für den Kontakt zwischen dem Kupfer- und dem Goldbonddraht sorgt. Nimmt man großzügig geschätzt an, dass sich an der Petrischale der Silberleitlack über eine Fläche mit 1 cm Länge und 2 mm Breite erstreckt, die Petrischale eine Dicke von 0,8 mm hat und das Polystyren, aus dem die Petrischale besteht, eine relative Permittivität von 2,7 hat, dann beläuft sich diese parasitäre Kapazität auf etwa 600 fF. Ein Teil dieser Fläche wird noch vom PMMA verdeckt, in dem der Golddraht eingebettet ist. Somit wäre diese Kapazität aller Wahrscheinlichkeit nach noch kleiner.

Es wird daher angenommen, dass sich die gemessene Kapazität aus Vorgängen ableitet, die an der Elektrodenoberfläche stattfinden, und daher im Ersatzschaltbild allein mit dem Streuwiderstand parallel geschaltet ist. Neben der Doppelschichtkapazität der Helmholtz-Doppelschicht gibt es auch noch die Gouy-Chapman-Kapazität. Diese kommt aber erst bei hohen Verdünnungen unter 1 mM zum Tragen und ist zudem größer als die Kapazität der Helmholtz-Schicht (Schmickler, 1996). Daher scheidet diese als Erklärung aus.

Vielleicht hängt diese Kapazität mit dem Verhalten des Wassers an der Elektrodenoberfläche zusammen. Dadurch, dass Gold eine hydrophile Oberfläche darstellt, ist das Wasser an der Grenzfläche hochgeordnet, wodurch es eine sehr viel geringere Permittivität als das Wasser im Rest der Messkammer hat. In einer Arbeit von Teschke et al. (2001) wurde ein Permittivitätsprofil über einer Glimmeroberfläche mit verschiedenen Lösungen erstellt. Bei 1 mM NaCl steigt die Permittivität ausgehend von 4 über eine Distanz von 10 nm sigmoidal auf 79 an. Die Steilheit dieser Kurve ist aber von der Elektrolytkonzentration abhängig. Das bedeutet, dass im Falle eines Spannungsabfalls innerhalb der ersten 40 nm sich die Kapazität C_2 bei den verschiedenen Verdünnungen deutlicher voneinander unterscheiden müsste. Dieser Ansatz könnte allerdings die Ergebnisse aus 5.4.2.1 erklären. Indem die Zelle das oberflächennahe Wasser verdrängt und eine ähnliche Kapazität durch die Zellmembran an dessen Stelle tritt, macht sich kein signifikanter Unterschied in den Impedanzspektren bemerkbar. Weitere Untersuchungen mit anderen Elektrolyten, die im Vergleich zu NaCl andere Permittivitätsprofile aufweisen (Teschke et al., 2001) und damit andere Kapazitäten zeigen würden, konnten aus Zeitgründen nicht vorgenommen werden.

An dieser Stelle sei noch angemerkt, dass diese Erklärung zu C_2 höchst spekulativ ist und erst durch andere Messmethoden (wie z.B. AFM-Messungen) abgesichert werden müsste. Ein weiteres Problem bei dieser Erklärung ist, dass sich das von der Elektrode ausgehende elektrische Feld höchstwahrscheinlich einige μm in die Lösung ausbreitet und sich damit die Kapazität des vom elektrischen Feld erfassten Wassers verringern würde. Deswegen ist es sehr wahrscheinlich, dass diese Kapazität nur durch Verunreinigungen verursacht wurde und es sich hierbei um ein Artefakt handelt.

R_3 kann nicht mit dem Widerstand der Gegenelektrode zusammenhängen. Die Austauschstromdichte bei nicht polarisierbaren Elektroden beträgt 1 A/cm^2 . Der Ag/AgCl-Draht hat einen Radius von 0,25 mm und ist etwa 5 mm weit in die Lösung eingetaucht, das bedeutet, die Gegenelektrode hat eine Oberfläche von etwa 8 mm^2 . Der Austauschstrom beträgt also 80 mA. Der Durchtrittswiderstand beträgt dann entsprechend Formel (11) etwa $315 \text{ m}\Omega$. Er kann aber auch nicht mit der Elektrolytleitfähigkeit zusammenhängen, da die Halbierung der Konzentration eine Verdoppelung der Widerstandes verursachen würde. Der Widerstand von Zuleitungen bewegt sich auch nur im Bereich von ein paar Ω .

6 Abschließende Bemerkungen

Das eigentliche Ziel war es, an ein und der selben Zelle die Messung eines Signals über eine Patch-Elektrode und eine der eigenhändig hergestellten Kohlefaser- bzw Goldmikroelektroden zu realisieren. Letzten Endes gelang dies aus folgenden Gründen nicht:

Um die Zelle mit der Patch-Elektrode auf der Oberfläche der Mikroelektrode zu positionieren, muss diese mit Trypsin behandelt werden, um sie von der Oberfläche des Kulturgefäßes abzulösen. Unter diesen Bedingungen ist es aber bei unzähligen Versuchen nicht gelungen, ein Gigaseal zu bilden, was möglicherweise darin begründet liegt, dass die Behandlung mit Trypsin für die Zellen zu hohen Stress bedeutet, was auch nach Korrespondenz mit einer im Umgang mit L929 Zellen erfahrenen Elektrophysiologin abgesichert werden konnte, obwohl Fibroblasten als sehr robust gelten und die Behandlung mit Trypsin auf drei Minuten begrenzt wurde. Bei den Versuchen, Whole-Cell-Clamp Messungen an den trypsinierten Fibroblasten durchzuführen, konnte ein Anstieg des Widerstandes mittels Testpuls auf etwa 100 M Ω festgestellt werden, der bei Ausübung von Unterdruck auf etwa 10 bis 50 M Ω absank, verbunden mit einer verlängerten Abklingzeit des kapazitiven Stromes, was ein Hinweis darauf wäre, dass die Zellmembran durchbrochen wurde. Nach dem Umschalten in den Current-Clamp Modus und Einstellung des Stromes auf 0 A wurde jedoch keine Änderung der Spannung ins Negative festgestellt, was an einer Überkompensation der Spannung zwischen Pipettenlösung und Kulturmedium gelegen haben könnte. Außerdem bewirkten Strompulse auch keine Änderung der Spannung. Überhaupt ist eine gelungene Sealbildung vonnöten, da sonst ein zu großer Anteil des Stroms über den Sealwiderstand fließt und so die Ergebnisse verfälscht (Takashima et al. 1988). Deswegen wurde letztendlich zur Herstellung der zur Positionierung der Zellen benutzten Pipetten auf das Zugprogramm, das für die Patchpipetten (P10 (B)) vorgesehen ist, zu Gunsten des Programmes P(B)14 verzichtet, da diese nicht so fragil sind. Man kann an Abb. 25 erkennen, dass die Durchsicht bis zur Elektrodenoberfläche wegen des Plexiglasses extrem schlecht ist, was Versuche, eine Zelle anzupatchen nochmals sehr stark erschwert hätte. Dass die Zellen beim Kontakt mit den Goldelektroden nicht erkannt wurden ist unerwartet, da diese eigentlich vom elektrischen Feld erfasst werden sollten und bei einer Frequenz um 1 MHz die Zellmembran polarisiert werden sollte.

Die passiven Elemente der Goldelektrode konnten bei der Verdünnungsreihe mit PBS relativ gut identifiziert und bestimmt werden, vor allem der Widerstand des Mediums und die Doppelschichtkapazität der Elektrode. Man könnte in zukünftigen Experimenten versuchen, die Zellen statt in Kulturmedium in PBS zu überführen und dann eine vergleichende Impedanzmessung zwischen blanker und mit Zelle besetzter Elektrode durchzuführen, um den Einfluss von größeren Molekülen wie Zucker und Aminosäuren auszuschließen. Was noch hätte versucht werden können, um die Qualität der Goldelektroden zu verbessern, wäre eine kurze Behandlung der Elektrodenoberfläche mit Iod-Kaliumiodid-Lösung, was eventuell zu einer Glättung der Oberfläche führt.

7 Danksagungen

Die Anfertigung einer Masterarbeit kann niemals das Werk einer einzelnen Person sein, deswegen sollen an dieser Stelle alle Beteiligten erwähnt werden, die mir sowohl moralisch als auch praktisch zur Seite gestanden sind. Zunächst einmal möchte ich mich bei meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Uwe Pliquet für die Möglichkeit bedanken, diese Masterarbeit anfertigen zu dürfen und für seine Hilfe bei der Simulation der Messergebnisse, sowie bei Frau Laura Diaz und Herrn Danny Echtermeyer für die Bereitstellung der für die Messungen nötigen MATLAB Programme. Herr Tobias Förster und Frau Martina Lackner waren eine große Hilfe im Zellkulturlabor. Den Unterredungen mit Frau Ciria Hernandez von der Vanderbilt Medical School in Nashville, Frau Charlotte Brady von der University of Edinburgh und Herrn John Minna vom University of Texas Southwestern Medical Center kamen sehr große Bedeutung zu. Handwerkliche Arbeiten konnten nur durch die Hilfe von Herrn Florian Philipp, Herrn Holger Rothe und den Mitarbeitern der Werkstatt ermöglicht werden. Zu guter Letzt möchte ich mich noch bei meinen KommilitonInnen und den restlichen Mitarbeitern für die anregenden Gespräche am Mittagstisch und in den Kaffeepausen sowie bei meiner Familie für die moralische Unterstützung und die Korrekturen bedanken.

8 Literatur

- Barthel A., Nacke T., Frense D., Pliquett U. (2012) Electrodes – the challenge in electrical characterization of biological material, *Journal of Physics: Conference Series*, 407, 012027
- Bove M., Grattarola M., Martinoia S., Verresschi G. (1995) Interfacing cultured neurons to planar substrate microelectrodes: characterization of the neuron-to-microelectrode junction, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 38, 255 – 265
- Cheung K. C., di Berardino M., Schade-Kampmann G., Hebeisen M., Pierzchalski A., Bocsi J., Mittag A., Tárnok A. (2010) Microfluidic impedance-based flow cytometry, *Cytometry Part A*, 77A, 648 – 666
- Fox S. W. (1965) A theory of macromolecular and cellular origins, *Nature*, 205, 328 - 340
- Fox K., Armstrong-James M., Millar J. (1980) The electrical characteristics of carbon fibre microelectrodes, *Journal of Neuroscience Methods*, 3, 37 - 48
- Hamann C. H., Vielstich W. (2005) *Elektrochemie*, Wiley-VCH Verlag GmbH und Co. KGaA
- Hamill O. P., Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigworth F. J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell-free membrane patches, *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 391, 85 - 100
- Henkart M. P., Nelson P. G. (1979) Evidence for an intracellular calcium store releasable by surface stimuli in fibroblasts (L cells), *The Journal of General Physiology*, 73, 655 – 673
- Hodgkin A. L., Huxley A. F. (1952) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve, *Journal of Physiology*, 117, 500 - 544
- Holmes D., Sun T., Morgan H., Holloway J., Cakebread J., Davies D. (2007) Label-free differential leukocyte counts using a microfabricated, single-cell impedance spectrometer, *IEEE SENSORS Conference*, 1452 - 1455
- Hosoi S., Slayman C. L. (1985) Membrane voltage, resistance and channel switching in isolated mouse fibroblasts (L cells): A patch-electrode analysis, *Journal of Physiology*, 367, 267 - 290
- Jorcin J., Orazem M. E., Pébère N., Tribollet B. (2006) CPE analysis by local electrochemical impedance spectroscopy, *Electrochimica Acta*, 51, 1473 – 1479

- Krommenhoek E. E., Gardeniers J. G. E., Bomer J. G., Van den Berg A., Li X., Ottens M., van der Wielen L.A. M., van Dedem G.W.K., Van Leeuwen M., van Gulik W. M., Heijnen J. J. (2006) Monitoring of yeast cell concentration using a micromachined impedance sensor, *Sensors and Actuators B*, 115, 384 - 389
- Lamb J. F., MacKinnon M. G. A. (1971) The membrane potential and permeabilities of the L cell membrane to Na, K and Chloride, *Journal of Physiology*, 213, 683 – 689
- Markx .G. H., Davey C. L. (1999) The dielectric properties of biological cells at radiofrequencies: applications in biotechnology, *Enzyme and Microbial Technology*, 25, 161 - 171
- Millar J., Pelling C. W. A. (2001) Improved methods for construction of carbon fibre electrodes for extracellular spike recording, *Journal of Neuroscience Methods*, 110, 1 - 8
- Molleman A. (2003) *Patch Clamping: An Introductory Guide to Patch Clamp Physiology*, John Wiley & Sons, Ltd.
- Neher E., Sackmann B. (1976) Single channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres, *Nature*, 260, 799 - 802
- Nelson P.G., Peacock J., Minna J. (1972) An active electrical response in fibroblasts, *The Journal of General Physiology*, 60, 58 - 71
- Ngyen T. A., Yin T., Reyes D., Urban G. A. (2013) Microfluidic chip with integrated electrical cell-impedance sensing for monitoring single cancer cell migration in three-dimensional matrixes, *analytical chemistry*, 85, 11068 - 11076
- Okada Y., Doida Y., Roy G., Tsuchiya W., Inouye K., Inouye A. (1977a) Oscillations of membrane potential in L cells, 1. Basic Characteristics, *Journal of Membrane Biology*, 35, 319 – 335
- Okada Y., Tsuchiya W., Inouye A. (1979) Oscillations of membrane potential in L cells, 4. Role of intracellular Ca^{2+} in hyperpolarizing excitability, *Journal of Membrane Biology*, 47, 357 – 376
- Okada Y., Tsuchiya W., Yada T. (1982) Calcium channel and calcium pump involved in oscillatory hyperpolarizing responses of L-strain mouse fibroblasts, *Journal of Physiology*, 327, 449 - 461
- Pasqualotto E., Ferrario A., Scaramuzza M., De Toni A., Maschietto M. (2012) Monitoring electropermeabilization of adherent mammalian cells through electrochemical impedance spectroscopy, *Procedia Chemistry*, 6, 79 – 88

Pliquett U., Frense D., Schönfeldt M., Frätzer C., Zhang Y., Cahill B., Metzen M., Barthel A., Nacke T., Beckmann D. (2010) Testing miniaturized electrodes for impedance measurements within the β -dispersion – a practical approach, *Journal of Electrical Bioimpedance*, 1, 41 - 55

Pliquett U. (1991) Elektrische Netzwerkanalyse biologischer Gewebe, Ingenieurhochschule Mittweida, Diss.

Rahman A. R. A., Price D. T., Bhansali S. (2007) Effect of electrode geometry on the impedance evaluation of tissue and cell culture, *Sensors and Actuators B*, 127, 89 – 96

Robinson D. A. (1968) The electrical properties of metal microelectrodes, *Proceedings of the IEEE*, 56, 1065 - 1071

Sabuncu A. C., Zhuang J., Kolb J. F., Beskok A. (2012) Microfluidic impedance spectroscopy as a tool for quantitative biology and biotechnology, *Biomicrofluidics*, 6, 034103

Schmickler W. (1996) Grundlagen der Elektrochemie, Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH

Schwan H.P. (1957) Electrical properties of tissue and cell suspensions, *Advances in Biological and Medical Physics*, 5, 147 - 209

Schwan H.P. (1994) Electrical properties of tissues and cell suspensions: Mechanisms and models, *Engineering in Medicine and Biology Society, Engineering Advances: New Opportunities for Biomedical Engineers. Proceedings of the 16th Annual International Conference of the IEEE*, 1, 70a - 71a

Singer S. J., Nicolson G. L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of the cell membranes, *Science*, 175, 720 - 731

Takashima S., Asami K., Takahashi Y. (1988) Frequency domain studies of impedance characteristics of biological cells using micropipette technique, *Biophysical Journal*, 54, 995 - 1000

Teschke O., Ceotto G., de Souza E. F. (2001) Interfacial water dielectric-permittivity profile measurements using atomic force microscopy, *Physical Review*, 64, 1 - 10

Anhang

Einstellungen des DMZ - Pullers (Zeitz Instruments GmbH) für die verwendeten Zugprogramme

(nachzulesen auf der Webseite <http://zeitz-puller.org/Support/Manual/6-Tables/6-tables.html>, 27.10.2015, 14:27)

	P 10	P 12	P14
P(A)			
H	400	500	800
F(TH)	020	040	100
s(TH)	020	030	024
t(H)	050		
s(H)	050		
AD	121	010	121
P(B)			
H	560	650	750
F(TH)	025	020	040
s(TH)	010	015	017
t(H)	030	100	000
s(H)	000	000	003
t(F1)	120	290	000
F1	170	400	038
s(F2)	002	005	004
F2	185	700	185
AD	245	000	000

Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen benutzt habe. Alle Gedanken, die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch noch nicht veröffentlicht.

Ort, Datum

Unterschrift